



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI VYUŽITÍ ODPADNÍCH LIPIDŮ A GLYCEROLU K PRODUKCI KAROTENOIDŮ KVASINKAMI.

POTENTIAL USE OF WASTE LIPID SUBSTRATES AND GLYCEROL TO PRODUCTION OF
CAROTENOIDS BY YEASTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

IVETA KOSTOVÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0600/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Iveta Kostovová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Možnosti využití odpadních lipidů a glycerolu k produkci karotenoidů kvasinkami.

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - přehled kvasinkových producentů karotenoidů, přehled využitelných typů substrátů jako nutričních zdrojů.
2. Optimalizace metod kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních lipidických substrátech a glycerolu, stanovení aktivit lipázy.
3. Sledování produkce karotenoidů kvasinkami s využitím odpadních lipidů a glycerolu jako zdroje uhlíku.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Iveta Kostovová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem předložené bakalářské práce bylo využití lipidických odpadů a odpadního glycerolu jako zdrojů uhlíku při kultivaci karotenogenních kvasinek. Celkem bylo ke kultivaci použito šest kmenů kvasinek: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus*.

Všechny studované kmeny kvasinek byly schopny využít jak glycerol, tak řepkový olej jako zdroj uhlíku. Kultivace na oleji byla u většiny kmenů doprovázena sníženou produkcí karotenoidů a pouze v některých případech zvýšenou produkcí ergosterolu, lykopenu a biomasy. Většina kmenů kvasinek kultivovaná na glycerolu produkovala zvýšené množství karotenoidů i biomasy. Jako nejlepší producent karotenoidů i biomasy byl prokázán kmen *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4, kultivovaný na médiu obsahujícím glukózu a glycerol v poměru 1:1.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenoidy, *Rhodotorula* sp., *Cystofilobasidium* sp., *Sporobolomyces* sp., glycerol, olej.

ABSTRACT

The aim of this study was use of lipid waste substrates and waste glycerol as carbon sources for red yeasts. Six yeast strains, namely *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus* and *Sporobolomyces shibatanus* were used for cultivation.

All studied yeast strains were able to utilize glycerol and rapeseed oil as a carbon source. Cultivation in oil medium was in most of strains accompanied by decreased production of carotenoids. Increased production of ergosterol, lycopene and biomass was observed in some strains only. Most of yeast strains cultivated in glycerol medium produced increased amount of biomass as well as carotenoids. The best producer of biomass and pigments was yeast strain *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4 grown in medium containing glucose and glycerol in a 1:1 ratio.

KEYWORDS

Carotenoids, *Rhodotorula* sp., *Cystofilobasidium* sp., *Sporobolomyces* sp., glycerol, oil.

KOSTOVOVÁ, I. Možnosti využití odpadních lipidů a glycerolu k produkci karotenoidů kvasinkami. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 63 s. 15 s. příloh. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Možnosti využití odpadních lipidů a glycerolu k produkci karotenoidů kvasinkami jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc, za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce a Ing. Andree Háronikové za velikou ochotu a pomoc při řešení experimentální části práce. Dále bych ráda poděkovala za finanční podporu této práce projektem CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

OBSAH

Obsah	6
1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Karotenoidy	9
2.1.1 Struktura karotenoidů	9
2.1.2 Vlastnosti karotenoidů	11
2.1.3 Využití karotenoidů	12
2.2 Kvasinky	13
2.2.1 Cytologie kvasinek	13
2.2.2 Rozmnožování kvasinek	14
2.2.3 Kvasinky produkující karotenoidy	16
2.2.4 Metabolity karotenogenních kvasinek	20
2.2.5 Nutriční zdroje aktuálně využívané k produkci karotenoidů	24
3 Cíle práce	27
4 Experimentální část	28
4.1 Použité chemikálie	28
4.2 Přístroje a pomůcky	29
4.3 Postupy práce	30
4.3.1 Kultivace mikroorganismů	30
4.3.2 Kultivace na oleji	30
4.3.3 Kultivace na glycerolu	31
4.3.4 Stanovení množství biomasy	33
4.3.5 Stanovení aktivity lipázy	33
4.3.6 Mikroskopické pozorování buněk	34
4.3.7 Zpracování biomasy	34
4.3.8 Izolace karotenoidů a ergosterolu zmýdlením	34
4.3.9 Extrakce	34
4.3.10 Úprava vzorků pro HPLC	34
4.3.11 Analýza karotenoidů pomocí HPLC	34
4.3.12 Identifikace a kvantifikace karotenoidů	35

5	Výsledky a diskuze	36
5.1.1	Kultivace na oleji	36
5.1.2	Kultivace na glycerolu	45
6	Závěr	59
	Literatura	60
	Seznam použitých zkratk	62
	Seznam příloh	63

1 ÚVOD

Karotenoidy slouží v lidském organismu jako významné biologické antioxidanty, jako regulátory imunitního systému a jsou proto předmětem intenzivního zkoumání. Mnohé studie předpokládají, že antioxidační aktivita karotenoidů je klíčovým faktorem při snižování výskytu mnoha nemocí. Lidský organismus ale není schopen syntézy karotenoidů a musí je proto přijímat stravou. Farmaceutický průmysl produkuje nejrozličnější vitamínové preparáty, potravinové doplňky a barviva.

Výskyt karotenoidů byl prokázán u většiny rostlin, kde jsou součástí fotosyntetického aparátu, a také byly prokázány u některých druhů kvasinek, kde jsou součástí buněčné membrány a plní zde funkci fotoprotekce. V současné době je získávání karotenoidů extrakcí z rostlinných materiálů poměrně náročná a drahá záležitost, z tohoto důvodu jsou zkoumány možnosti optimalizace mikrobiologické produkce karotenoidů na různých odpadních substrátech.

Těmito odpadními substráty mohou být různé sekundární produkty zemědělství, potravinářství a dalších odvětví. Mohou to být i rostlinné oleje, které špatným skladováním žlukly, nebo byly již použity k tepelné úpravě pokrmů a stávají se tedy odpadem, jež je ekologickou zátěží pro životní prostředí. Tyto odpadní látky bývají v dnešní době zpracovávány na bionaftu, a nebo také mohou sloužit jako levný zdroj uhlíku a nenasyčených mastných kyselin pro kultivaci mikroorganismů. Dalším odpadním produktem dnešní doby je surový glycerol, který vzniká jako odpad v průběhu stále se zvyšující produkce bionafty. Obsahuje mnoho nečistot jako je například voda, anorganické a organické soli, stopy glyceridů, mýdel a zeleninových pigmentů a jeho přečištění na čistý glycerol je velmi nákladné, ale z hlediska biotechnologického představuje i surový glycerol využitelný zdroj uhlíku pro kultivaci mikroorganismů.

Předložená bakalářská práce se zabývá optimalizací metod kultivací karotenogenních kvasinek na odpadních lipidických substrátech a glycerolu. Jako lipidický odpadní substrát byl využit řepkový olej, jenž byl jediným zdrojem uhlíku v médiích. Obdobně tomu bylo i v případě glycerolových médií s tím, že typy těchto médií byly dva a druhé médium obsahovalo glycerol spolu s glukosou v poměru 1:1. Na těchto médiích byly kultivovány následující kmeny karotenogenních kvasinek: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra* (nyní *Rhodotorula mucilaginosa*), *Rhodotorula aurantiaca*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus*. Cílem kultivací jednotlivých kmenů bylo stanovit podmínky kultivace a médium, jehož složení by vedlo ke zvýšené produkci karotenoidů a zároveň negativně neovlivnilo nárůst biomasy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou rozšířenými žlutými a oranžovými pigmenty bakterií, řas, kvasinek, rostlin a zvířat. Doposud bylo zjištěno celkem 750 přírodně se vyskytujících druhů karotenoidů. Karotenoidy hrají významnou roli fotoprotektivní, schopnost inaktivace reaktivních forem kyslíku, pohlcování záření krátkých vlnových délek záření a účastní se regulace fyzikálních vlastností biomembrán v lidském i zvířecím organismu. Lidé ani zvířata nejsou schopni biosyntézy karotenoidů a jsou tedy zcela závislí na jejich příjmu potravou [1].

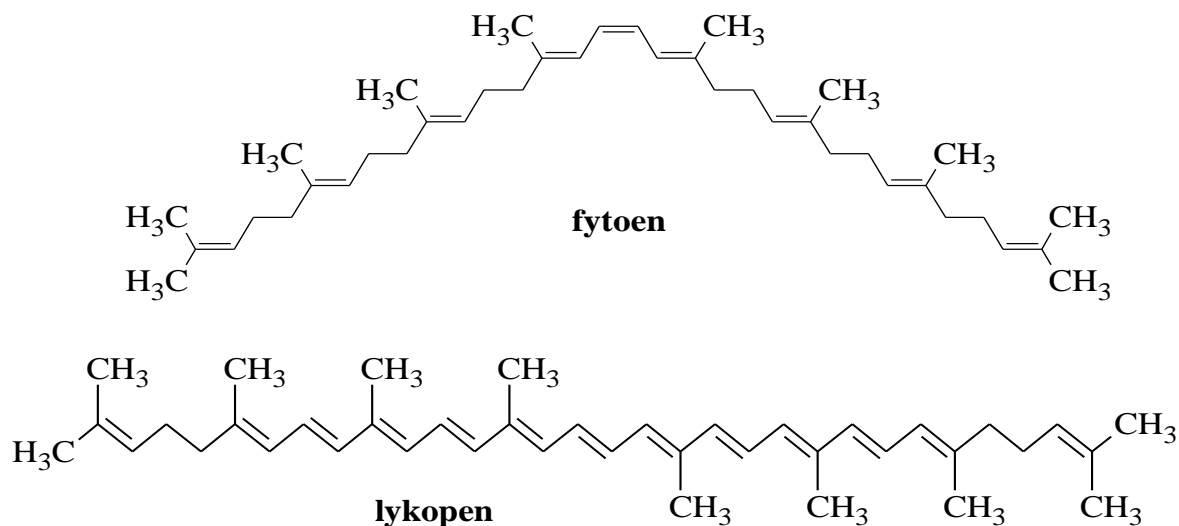
Tyto sloučeniny jsou také přítomny ve všech fotosyntetizujících organismech, jako jsou bakterie, sinice, řasy a vyšší rostliny, kde slouží jako pomocné anténní systémy fotosyntetického aparátu. U rostlin se vyskytují v květech, ovoci a také v kořenech a způsobují žluté až červené zbarvení např.: mrkve, rajčat a paprik. U rostlin slouží jako hormony, pigmenty a vonné látky [2].

2.1.1 Struktura karotenoidů

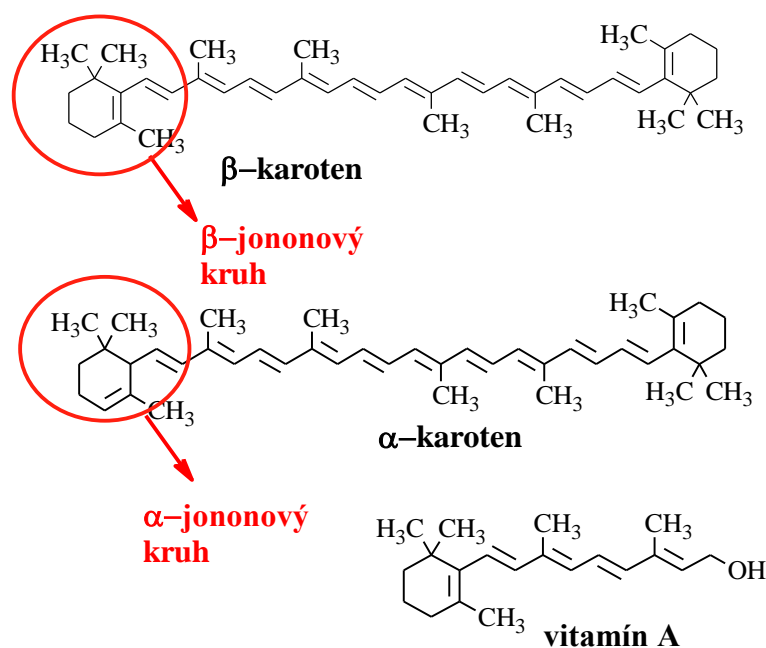
Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy formálně obsahující osm izoprenových jednotek. Jejich barevnost je způsobena řetězcem konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách a jejich kombinacích. Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny [3]:

2.1.1.1 Uhlovodíky nazývané karoteny

Nejjednodušším typem karotenů je acyklický polynenasycený uhlovodík fytoen. Acyklické karoteny se, s výjimkou lykopenu, nacházejí v potravinářských materiálech jen v malém množství. Doprovázejí zde alicyklické karoteny a xantofyly. Alicyklické karoteny vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací na jednom nebo obou koncích acyklických ψ -karotenů, kdy se tvoří β -jononové struktury v β -karotenech a α -jononové struktury v ϵ -karotenech. α -karoten, β -karoten a γ -karoten jsou prekurzory retinolu. Řadí se proto mezi provitaminy A. Konverzí jedné molekuly β -karotenu vznikají dvě molekuly vitamínu A [3, 4].



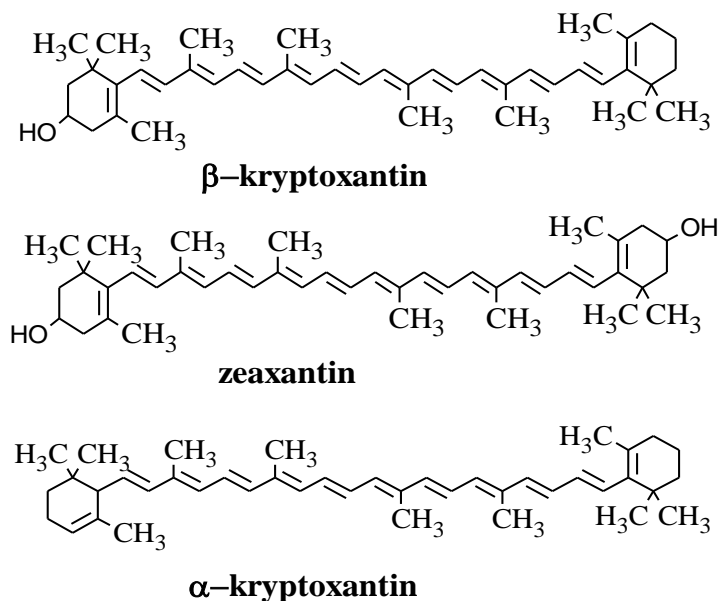
Obrázek 1: Acyklické karoteny lykopen a fytoen [3].



Obrázek 2: Obrázek strukturních vzorců vitamínu A, β-karotenu a α-karotenu [3, 4].

2.1.1.2 Kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, které se nazývají xantofyly.

Primárně vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů. V potravinách se v malém množství vyskytují xantofyly odvozené od acyklických karotenů, jako jsou např.: 1,2-epoxylykopen, což je pigment přítomný v rajčatech. Kryptoxanthiny jsou monohydroxysubstituované deriváty alicyklických karotenů. Vyskytují se mnohem častěji, než xantofyly. Nacházejí se např.: v rostlinných pletivech (α-kryptoxanthin). Obecně jsou xantofyly hlavními karotenoidy rostlin [3].



Obrázek 3: Hydroxysubstituování a dihydroxysubstituované karotenoidy [3].

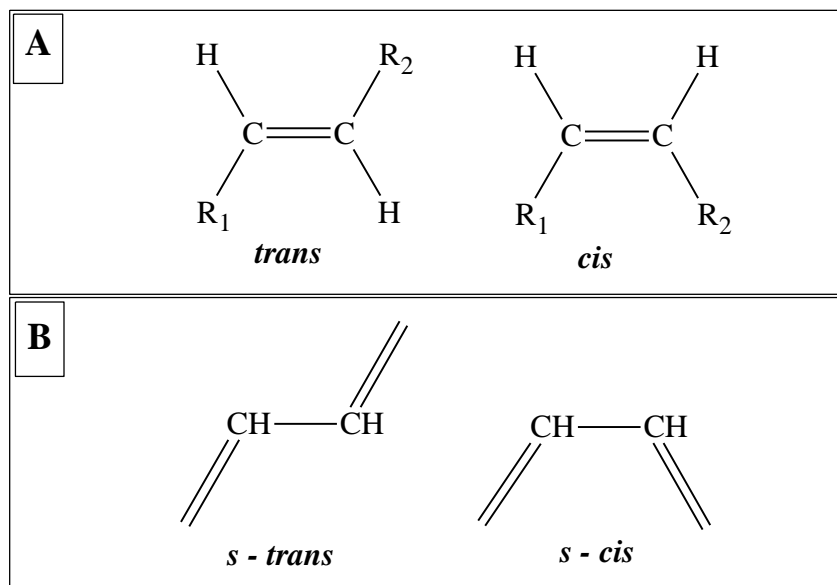
Oxidací těchto sloučenin vznikají tzv **alleny** (dieny s kumulovanými dvojnými vazbami), které se vzácně vyskytují v přírodě. Jsou to např.: Neoxanthin a foliaxanthin. Přesmykem 5,6-epoxidů vzniká další skupina xantofylů označovaná jako **cyklopen-tylketony** nebo také **κ -karoten** např.: kapsanthin a kapsorubin. [3].

Významnou avšak malou skupinou xanthofylů jsou **apokarotenoidy**. Jsou to sloučeniny, které obsahují v molekule méně než 40 atomů uhlíku. Vznikají štěpením molekuly karotenoidů. Tyto sloučeniny vykazují různé biologické funkce. Nejvýznamnějším apokarotenoidem je vitamin A₁ [3].

2.1.2 Vlastnosti karotenoidů

Karotenoidy jsou extrémně hydrofobní molekuly s malou nebo žádnou rozpustností ve vodě. Dalo by se tedy očekávat, že budou omezeny na hydrofobní oblasti v buňce, jako je hydrofobní jádro biomembrán, kromě případů, kdy se nacházejí společně s proteiny, což jim umožňuje přístup k vodnímu prostředí. Polární funkční skupiny samozřejmě mohou změnit polaritu karotenoidů a umožňují jejich interakce s jinými molekulami [5].

Celková velikost a tvar molekuly jsou velmi důležité ve vztahu k vlastnostem i funkcím karotenoidů. Všechny barevné karotenoidy v trans konfiguraci mají konjugovaný systém dvojných vazeb a jsou to lineární molekuly. Cis izomery však již nejsou jednoduché lineární molekuly. Tendence cis-izomerů krystalizovat nebo agregovat je obvykle velmi malá, a proto cis-izomery mohou být snadněji rozložitelné, absorbovatelné, a transportované než trans-izomery [5].



Obrázek 4: A – cis a trans konfigurace jednoduchých vazeb polyenového řetězce, B - cis a trans konfigurace dvojných vazeb polyenového řetězce [4].

Karotenoidy mají v buňkách velkou schopnost fotoprotekce, která je realizována prostřednictvím zhášení singletového kyslíku, inaktivací volných radikálů kyslíku a zhášení excitovaných tripletových stavů molekul. Hydrofobní jádro biomembrán se skládá z polynenasycených mastných kyselin a je potenciálním terčem útoku volných kyslíkových radikálů, které mohou přímo vést k degradaci membrán. Kromě všech fyzikálních mechanismů zapojených do fotoprotektivního účinku karotenoidů ovlivňují karotenoidní pigmenty lipidové membrány, zejména jejich strukturní a dynamické vlastnosti a také snižují jejich oxidační degradaci. Přítomnost polárních karotenoidů v lipidické vrstvě fosfolipidů má vliv na fyzikální vlastnosti membrány, modulaci membránové fluidity a mění bariérové vlastnosti pro průnik malých molekul včetně kyslíku [1].

2.1.3 Využití karotenoidů

Karotenoidy jsou od nepaměti používány v potravinářském průmyslu jako barviva potravin. K tomuto účelu se používají čerstvé i sušené části rostlin a palmový olej, který také obsahuje karotenoidní pigmenty. Přidávají se do krmiva dojníc i drůbeže pro zajištění žádoucí pigmentace mléka, vajec a masa. Používají se k barvení mnoha potravin např.: margarínů, sýrů, jogurtů, zmrzlin, ovocných džusů, dresingů, mouky, těstovin atd. [3].

Karotenoidy působí jako biologické antioxidanty a jako regulátory imunitního systému, které jsou předmětem intenzivního zkoumání. Mnohé studie předpokládají, že antioxidační aktivita karotenoidů je klíčovým faktorem při snižování výskytu mnoha nemocí, ale je třeba také poznamenat, že v některých vysoce rizikových skupinách (např. kuřáci), mohou mít vysoké dávky karotenoidů nežádoucí účinky. Také bylo zjištěno, že karotenoidy indukují apoptózu T-lymfocytů buněčné linie a mohou chránit stabilitu genomu [6].

2.2 Kvasinky

České slovo kvasinky a jeho ekvivalenty v mnoha jiných jazycích jsou založeny na fermentačních schopnostech kvasinek zkvašovat sacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Slovo kvasinka je tedy často spojováno se schopností kvasit. Ve skutečnosti, to není neobvyklé, v některých oblastech molekulární biologie jsou slova "kvasnice" a "*Saccharomyces*" chápána jako synonyma. Objev, že některé taxony patří do čeledi *Basidiomycetes*, rozšířila vnímání přírody kvasinek. Důsledkem tohoto zjištění bylo zařazení těchto heterotrofních eukaryotických organismů mezi houby [7, 9].

2.2.1 Cytologie kvasinek

Vegetativní kvasinková buňka se skládá ze silné a pevné buněčné stěny, cytoplazmy, jež obsahuje mnoho membránových struktur a jádro, které je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou. Pohybové orgány, jako jsou bičíky, kvasinky nemají [7].

2.2.1.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna udává buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy prostředí. Obsahuje velké póry, jimiž mohou procházet pouze nízkomolekulární látky. Hlavní složkou buněčné stěny je síť polysacharidů (glukany), která je vyplněna bílkoviny. Obsahuje malé množství lipidů a fosfolipidů a dále fosforečnany vázané esterovými vazbami na polysacharidy. Tyto fosfátové zbytky spolu se skupinami $-COOH$ bílkovin udávají buňkám kvasinek negativní náboj. Tento náboj ovlivňuje adsorpci látek z živného prostředí. Na povrchu stěny kvasinek mohou být patrné jizvy po pučení, nazývané jizvy zrodu [7].

2.2.1.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána často nazývaná plazmalema je poměrně tenká membrána o tloušťce 7,5-8 nm. Skládá se z lipidů a proteinů. Je sídlem transportních mechanismů a umožňuje příjem, či transport látek z buňky do prostředí. Je volně propustná pouze pro malé molekuly bez náboje, čímž tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím [7].

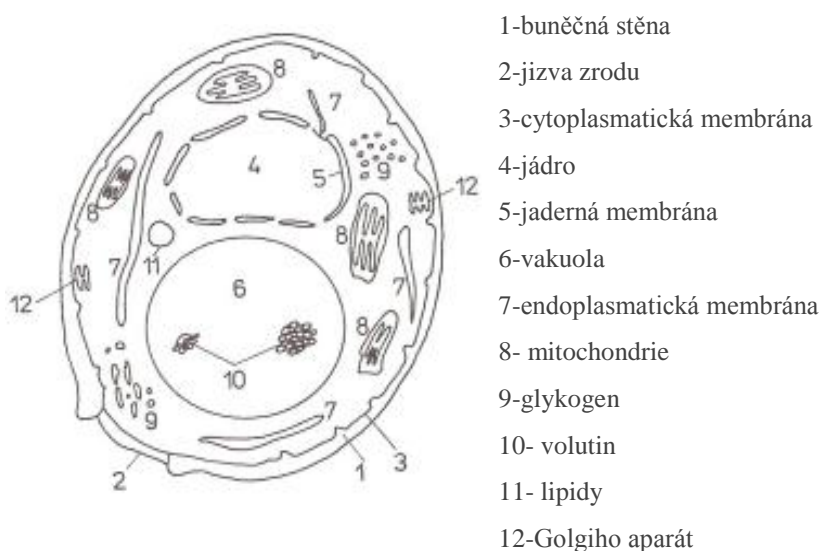
2.2.1.3 Cytoplasma

Je u mladých buněk průhledná homogenní hmota, obsahující membránové útvary, jakými jsou endoplasmatické retikulum, mitochondrie, vakuoly, Golgiho aparát a jádro. Endoplasmatické retikulum je tvořeno systémem dvojitých membrán s poměrně velkými póry, na jejichž povrchu se nacházejí zrníčka polynomů, v nichž se syntetizují bílkoviny. Mitochondrie jsou sídlem dýchacích enzymů a probíhá zde syntéza některých mitochondriálních bílkovin. Jsou nositeli mimojaderné dědičnosti, protože obsahují vlastní DNA i RNA. Vnitřní membrána tvoří vchlípeniny směrem dovnitř, neboli kristy. Skládají se hlavně z fosfolipidů, lipidů a bílkovin.

Vakuola je kulovitý útvar obklopený jednoduchou membránou. Uvnitř vakuol se nacházejí hydrolytické enzymy, jako proteinasy, ribonukleasa a esteráza. Jsou tedy místem, kde dochází k rozkladu těch struktur buněk, které mají krátký poločas rozpadu (RNA a některé enzymy apod.). Dále obsahují polyfosfáty a velkou zásobu draselných

iontů, aminokyselin a purinů.

Golgiho aparát je membránový útvar připomínající několik propojených měchýřků nebo cisteren uložených rovnoběžně vedle sebe. Funkcí tohoto aparátu je nejspíše transport prekurzorů buněčné membrány z cytoplasmy přes cytoplasmatickou membránu. Jádru je od cytoplasmy odděleno dvojitou membránou s velkými póry. Jádru se nachází přibližně ve středu buňky a nacházejí se v něm chromozomy, jadérko a pólóvé tělísko [7].

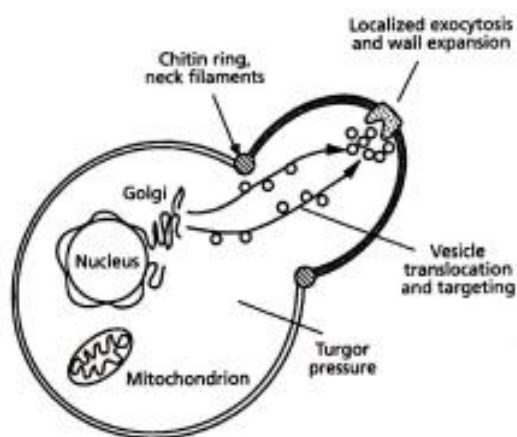


Obrázek 5: Buňka kvasinky [7]

2.2.2 Rozmnožování kvasinek

2.2.2.1 Vegetativní rozmnožování

Nejčastějším způsobem vegetativního rozmnožování kvasinek je pučení. Samotné pučení začíná v mateřské buňce, která již dosáhla kritické velikosti a dochází v ní k syntéze DNA a buněčných organel. Poté dochází k lokálnímu zeslabení buněčné stěny. Vlivem pnutí a turgoru dochází k vytlačování cytoplasmy v oblasti ohraničené novou buněčnou stěnou, která je syntetizována glukon- a chitinsyntetázou. Chitin, (polymer N-acetylglukosamin), vytváří prstenec pro spojení mezi mateřskou a dceřinou buňkou. Tento chitinový prstenec nakonec vytvoří charakteristickou jizvu zrodu po buněčném dělení. Nejprve do pupenu vstoupí drobné vakuoly a mitochondrie. Současně dojde k mitotickému dělení jádra a jeho migrace k pupenu. S jádrem přecházejí do buňky nově vytvořeného pupenu také další složky cytoplasmy. Po uzavření spojení mezi dorostlou dceřinou buňkou a mateřskou buňkou většinou dochází k jejich oddělení, ale v některých případech buňky zůstávají spojeny i po několikerém dělení. Celý proces buněčného dělení trvá za optimálních podmínek kolem dvou hodin [7].



Obrázek 6: Pučící buňka kvasinky (vlevo), jizva zrodu zachycená elektronovým mikroskopem (vpravo) [8]

2.2.2.2 Pohlavní rozmnožování

Mnohé kvasinky mají schopnost množit se pohlavně. Výsledkem tohoto rozmnožování jsou pohlavní spory. Na základě umístění pohlavních spor jsou kvasinky rozděleny na *Ascomycotina*, u nichž jsou spory uloženy v asku (askospory) a *Basidiomycotina*, u nichž jsou spory umístěné vně sporotvorných buněk (exospory) [7].

Při pohlavním rozmnožování dochází ke spájení dvou haploidních buněk (konjugace). Následnou karyogamií vzniká diploidní jádro, které se dále dělí meiózou ve čtyři haploidní jádra, která jsou základem pohlavních spor, nebo se dělí další mitózou a pak teprve vznikají spory. V životním cyklu kvasinek se pravidelně střídají haploidní a diploidní fáze buněk [7].

U askosporogenních kvasinek dochází při spájení dvou haploidních buněk ihned také ke karyogamii, čímž vzniká diploidní buňka, neboli zygota. Spájení může probíhat buď mezi stejně velkými buňkami, kdy se jedná o izogamní spájení, nebo mezi velkými a malými buňkami, což je příznačné pro heterogamní spájení. K heterogamnímu spájení může docházet mezi mateřskou a dceřinou buňkou. Spájení mezi buňkou a jejím potomkem je možné pouze u tzv. homothalických kmenů. Heterothalické kmeny, jsou pohlavně rozlišené kmeny kvasinek, u nichž ke spájení dochází mezi buňkami opačného párovacího typu [7].

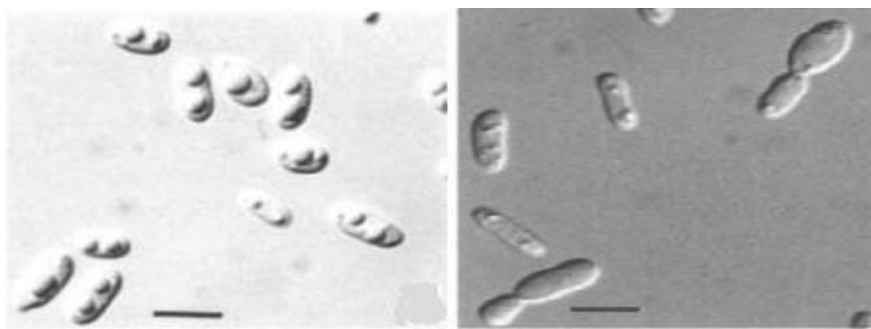
Druhy kvasinek tvořící exospory, zvané sporidie, byly zařazeny do rodů *Leucosporidium* a *Rhodospiridium*. Při spájení opačných párovacích typů dochází k tvorbě dvoujaderné micelární fáze, protože nedochází ke karyogamii. Po mitóze obou jader je každá buňka heterokaryotická. Po určité době dochází ke spájení jader v teliospoře, což je koncový, nebo interkalární kulovitý tmavý útvar se silnou stěnou. Teliospora pak klíčí ve formě protomycelia, v němž nastává meióza. Pučením se následně z protomycelia oddělují jednobuněčné sporidie [7].

2.2.3 Kvasinky produkující karotenoidy

Kvasinky produkující karotenoidy náleží mezi rody tvořící bazidiospory, tedy mezi *Basidiomycotina*. *Basidiomycotina* jsou dále děleny na perfektní a imperfektní stádia. Mezi perfektní stádia karotenogenních kvasinek náleží čeledi *Sporidiobolaceae*, kam náleží rody *Rhodosporidium* a *Sporidiobolus*, a rody *Cystofilobasidium*, *Xanthophyllomyces*, které náleží do čeledi *Filobasidiaceae*. Mezi imperfektní stádia karotenogenních kvasinek náleží rody *Rhodotorula* a *Sporobolomyces*, náležící do čeledi *Sporobolomycetaceae* a rody *Cryptococcus* a *Phaffia*, patřící do čeledi *Cryptococcaceae* [8].

2.2.3.1 *Cystofilobasidium*

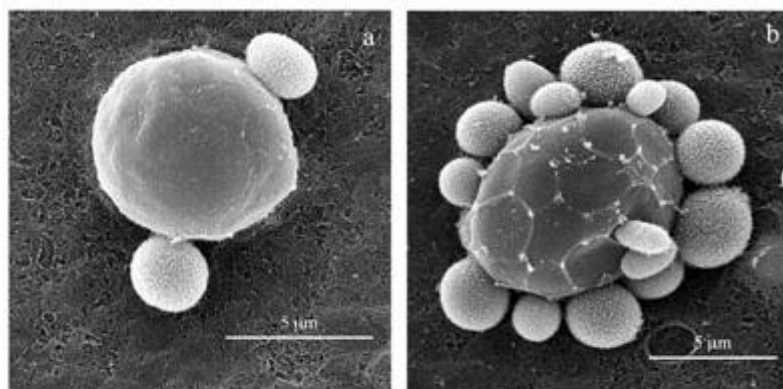
Díky přítomnosti karotenoidů tvoří oranžové, lososově až skořicově zbarvené kolonie. Tvar buněk je vejcovitě protáhlý. Nepohlavně se rozmnožují polárním nebo bipolárním pučením. Netvoří ballistokonidie. Některé druhy mohou vytvářet pseudohyfy. Při pohlavního rozmnožování vytváří pravá mycelia a tmavě pigmentované teliospory, které klíčí v přisedlé bazidiospory. Vytvářejí koenzymy Q9 a Q10 a obsahují xylulósu. Jednotlivé druhy karotenogenních kvasinek jsou *Cystofilobasidium bisporii*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*. Tyto druhy nejsou schopny zkvašovat glukósu a mají přísně aerobní metabolismus. *Cystofilobasidium capitatum* je kultivováno pro jeho vysokou produktivitu koenzymu Q 10, β -karotenu, torulenu a torularhodinu [9, 10].



Obrázek 7: Zleva *Cystofilobasidium bisporii* a *Cystofilobasidium capitatum* [9]

2.2.3.2 *Xanthophyllomyces*

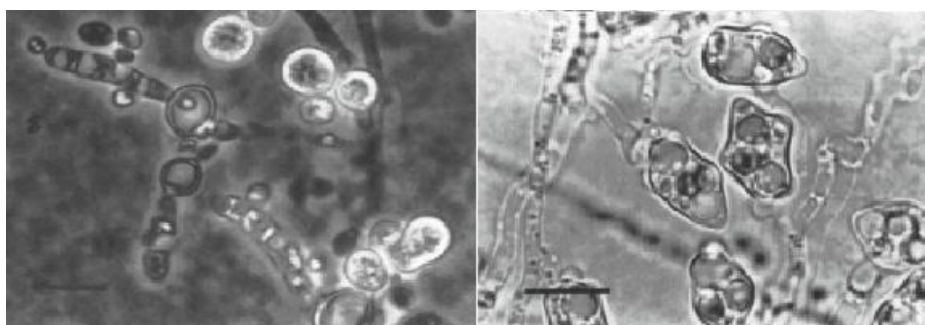
Rod *Xanthophyllomyces* se vegetativně rozmnožuje pučením. Buňky mohou být zapouzdřeny. Nevytváří pravé mycelium. Pohlavně se mohou rozmnožovat heterogamním spájemím mateřské a dceřinné buňky. Syntetizují karotenoidní pigmenty, vlivem nichž se kolonie zbarvují oranžově až lososově. Obsahují extracelulární sacharidy jako jsou xylózy a rhamnosy a produkují koenzym Q10. Za určitých podmínek jsou schopny asimilovat glukuronát. Druhem syntetizujícím karotenoidy je *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Bylo zjištěno, že kmeny *Xanthophyllomyces dendrorhous* izolované z různých částí světa vykazují jistou druhovou fungicidní aktivitu, která je smrtící pro kmeny *Kloeckera apiculata*, *Rhodotorula sloffiae* a *R. minuta* [9, 11].



Obrázek 8: Zleva bipolární pučení a multilaterální pučení *Xanthophyllomyces dendrorhous* [12].

2.2.3.3 *Rhodosporidium*

Barva kolonií na pevných médiích zahrnuje odstíny žluté, oranžové až červené. Rody *Rhodosporidium* tvoří karotenogenní pigmenty, obsahují koenzymy Q9 a Q10 a mohou také produkovat aminokyseliny a lipidy. Tvar kvasinek je vejčitý. Vegetativně se rozmnožují pučením. Nejsou schopny zkvašovat cukry. Jako zdroje energie mohou využívat galaktózu, trehalosu a glycerol, ale nedokáží již asimilovat laktosu, D-glucosamin, erythritol a inositol. Mezi rody *Rhodosporidium* náleží druhy *Rhodosporidium habjeuae*, *Rhodosporidium dacryoideum*, *Rhodosporidium fluviale*, *Rhodosporidium kratochvilouae*, *Rhodosporidium lusitaniae*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Rhodosporidium sphaerocarpum*, *Rhodosporidium toruloides*. V dnešní době je druh *Rhodosporidium toruloides* průmyslově kultivován jako zdroj povrchově aktivních látek, triacylglycerolů a nenasycených mastných kyselin [9, 13].

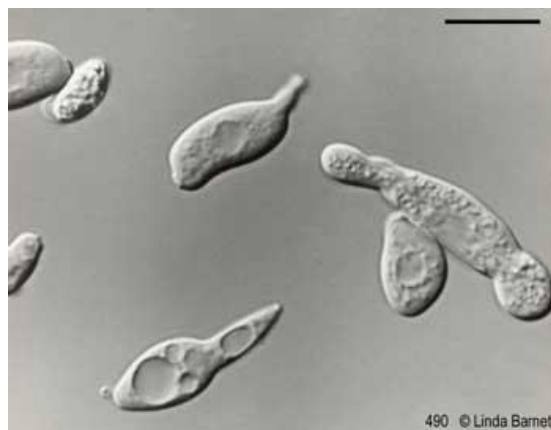


Obrázek 9: Zleva tvorba teliospor *Rhodosporidium kratochvilouae* a *Rhodosporidium toruloides* [9].

2.2.3.4 *Sporidiobolus*

Rod *Sporidiobolus* nezakvašuje žádné cukry. Buňky tvoří růžové až červené kolonie. Zbarvení kvasinek je dáno přítomností karotenoidů v buňkách a je zde také přítomen koenzym Q10. Vegetativně se rozmnožuje pučením, kdy mohou vznikat jak pseu-

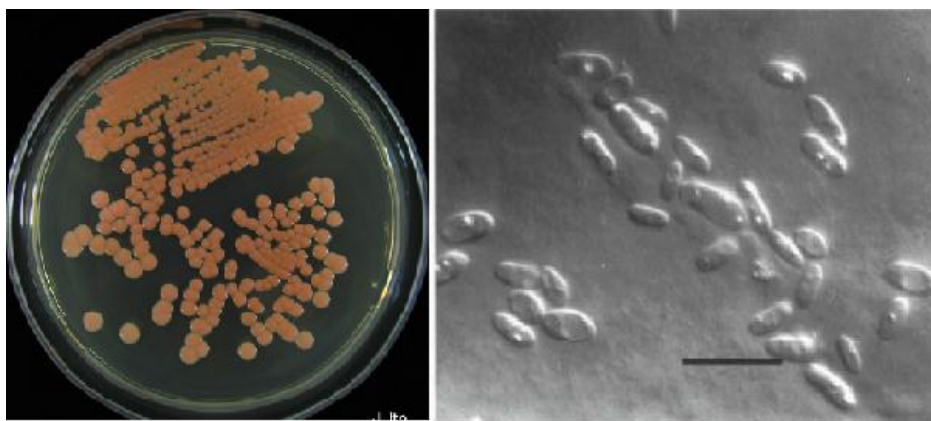
domycelia, tak i pravá mycelia. Pohlavní rozmnožování může být homothalické i heterothalické. Jednotlivé druhy rodu *Sporidiobolus* produkující karotenoidy jsou *Sporidiobolus johnsonii*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus ruineniae*, *Sporidiobolus salmonicolor*. Nacházejí se v žábrech, žaludcích a vnitřnostech krevet žijících v moři v oblasti Zhanjiang v Číně [9, 14].



Obrázek 10: *Sporidiobolus johnsonii* [9]

2.2.3.5 *Rhodotorula*

Buňky mají kulovitý až vejcovitý tvar. Vegetativně se rozmnožují multilaterálním nebo polárním pučením. Mohou vytvářet pseudomycelia i pravá mycelia. Některé kmeny jsou schopny syntetizovat červené nebo žluté pigmenty na sladinných agarech. Většina druhů postrádá schopnost asimilovat inositol. Druhy, které jsou naopak schopny asimilovat inositol nejsou schopny asimilovat D-glukuronát. Nejsou schopny kvasit sacharidy. Vytvářejí koenzymy Q-10 a Q-9. Některé druhy mohou představovat perfektní stádia *Rhodosporidium* a *Leucosporidium*. Druhy schopné syntetizovat karotenoidy jsou *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula lactosa*, *Rhodotorula mucilaogiusa*, *Rhodotorula diffluens* a *Rhodotorula acuta*. Kvasinky druhu *Rhodosporidium toruloides* jsou schopny kumulovat lipidy, které tvoří až 20 % sušiny. Z toho důvodu jsou využívány jako zdroj triacylglycerolů, povrchově aktivních látek, nebo jako zdroj nenasycených mastných kyselin [9, 13].



Obrázek 11: Zleva *Rhodotorula mucilaogiusa* a *Rhodotorula diffluens* [9, 14]

2.2.3.6 *Sporobolomyces*

Kolonie jsou zbarveny lososově-růžovou barvou, oranžově, červeně i žlutohnědě v důsledku tvorby karotenoidů. Tvar buněk je elipsoidní, vřetenovitý až cylindrický. Nedokáží zkvašovat cukry a obsahují ubichinon. Kolonie jsou většinou silně zvrásněny. Vedle pučících buněk vytvářejí také bohaté mycelium. Vyskytují se často na listí stromů a na jiných rostlinách odkud se dostávají do tekoucích i stojatých vod. Karotenogenní druhy jsou *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces ruber*, *Sporobolomyces salicinus*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces sasicola*, *Sporobolomyces shibatanus*, *Sporobolomyces singularis*, *Sporobolomyces subbrunneus* a *Sporobolomyces xanthus* [9].



Obrázek 12: Křížový roztěr kmene *Sporobolomyces roseus* [16]

2.2.3.7 *Phaffia*

Vegetativně se tento rod rozmnožuje pučením. Buňky mají elipsoidní tvar a vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích, občas mohou tvořit krátké řetězce. Syntetizují karotenogenní pigmenty zejména astaxanthin a v menší míře β -karoten. Kolonie jsou červené až losově-červené barvy. Nevytvářejí pravá mycelia, ale mohou vytvářet pseudomycelia. Mají schopnost zkvašovat cukry. Jako jiné zdroje uhlíku nejsou schopny asimilovat inositol. Produkují koenzym Q10 a jejich buňky obsahují xylulósu. Nejvýznamnějším druhem produkujícím karotenoidy je *Phaffia rhodozyma* [8]. V dnešní době jsou využívány mutantní kmeny *Phaffia rhodozyma* pro produkci astaxanthinu, protože divoké kmeny produkují astaxanthin v malé míře a jsou proto ekonomicky nevýhodné [17].



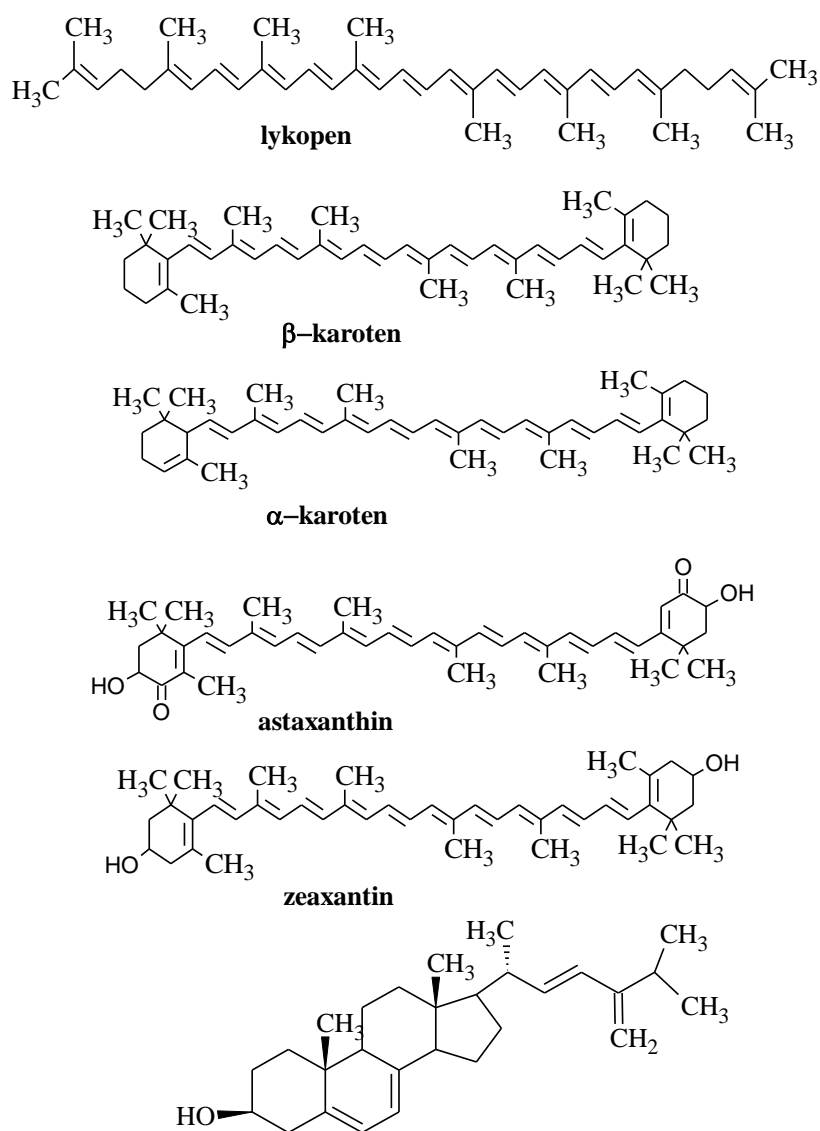
Obrázek 13: Křížový roztěr druhu *Phaffia rhodozyma* [16]

2.2.4 Metabolity karotenogenních kvasinek

Mezi hlavní metabolity karotenogenních kvasinek patří karotenoidy, jimiž jsou lykopen, α -karoten, β -karoten, astaxanthin a zeaxanthin. V buňkách kvasinek plní karotenoidy důležitou funkci fotoprotekce [18].

Důležitými látkami obsažených zejména v cytoplasmatické membráně kvasinek jsou lipidy. Lipidy tvoří chemicky rozmanitou skupinu triacylglycerolů, vosků, glykolipidů a fosfolipidů. Fosfolipidy jsou důležitou složkou buněčných membrán, která zlepšuje jejich prostupnost a elasticitu. Obsah neutrálních triacylglycerolů a fosfolipidů závisí na složení živného média a podmínkách kultivace. Kvasinky běžně obsahují 5 - 15 % tuku v sušině, ovšem karotenogenní kvasinky jsou schopny dosáhnout až několikanásobku (cca 60 % tuku v sušině) [8,18].

Významným metabolitem, který má ve spojení s fosfolipidy funkci při tvorbě lipidové dvojvrstvy membrán je ergosterol. Ergosterol je provitaminem D₂. Působením UV záření dochází ke vzniku vitamínu D [8, 19].



Obrázek 14: Hlavní metabolity karotenogenních kvasinek [2, 3, 4]

2.2.4.1 Biosyntéza karotenoidů

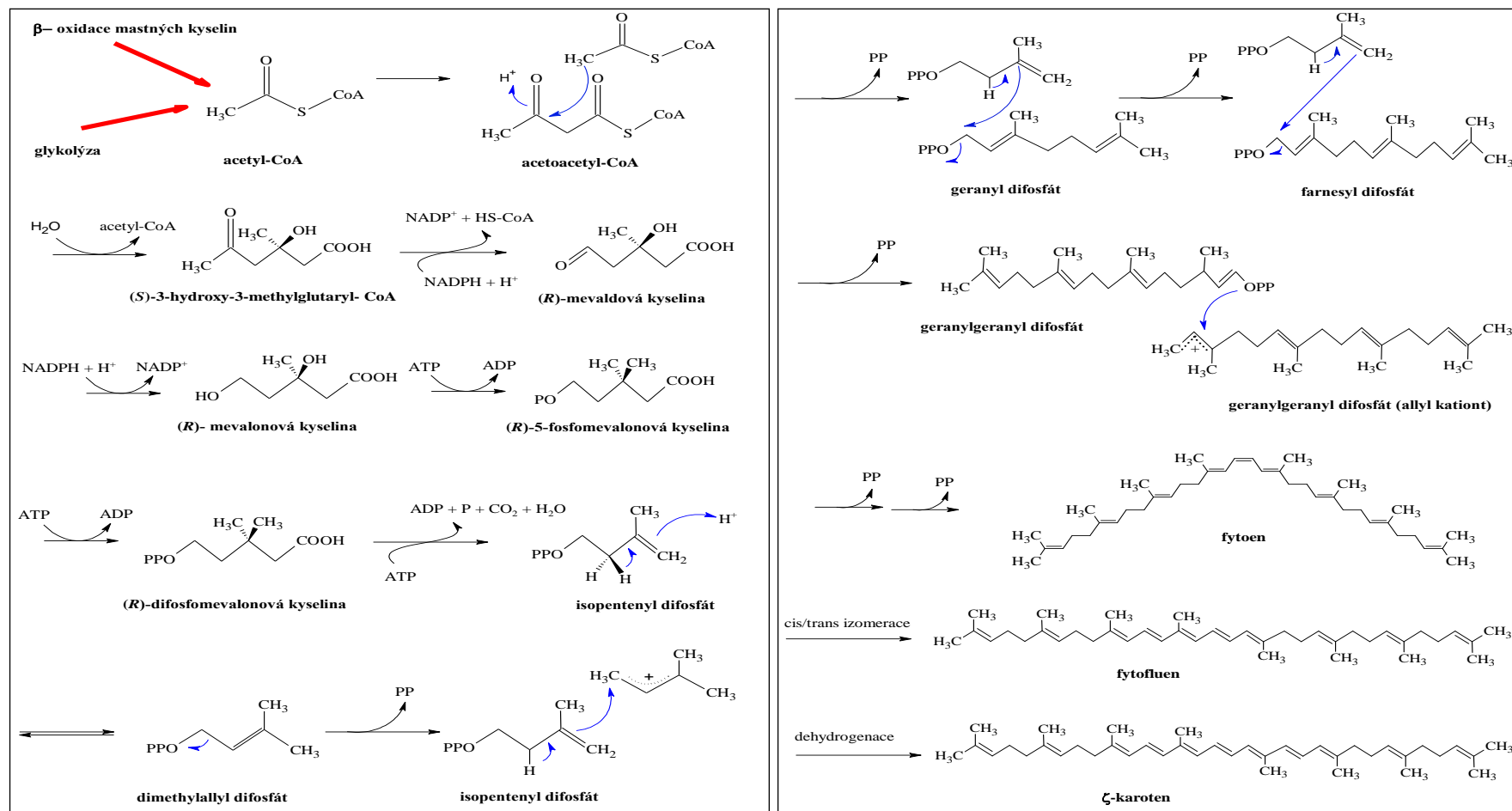
Biosyntéza karotenoidů probíhá obdobným způsobem jako syntéza látek terpenoidní povahy, tedy metabolickými drahami kyseliny mevalonové. Vstupní komponentou je acetyl koenzym A, který je produktem glykolýzy a β -oxidace mastných kyselin [18].

Kyselina mevalonová je vytvářena kondenzací tří molekul acetyl koenzymu A, kde první dvě molekuly acetyl-CoA jsou spojeny v acetoacetyl-CoA. Acetoacetyl-CoA reaguje s acetyl-CoA. Produktem této reakce je (*S*)-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA za účasti hydroxymethylglutaryl-CoA-syntházy. Poté dochází k redukci na (*R*)-mevaldovou kyselinu za účasti hydroxymethylglutaryl-CoA reduktázy. (*R*)-mevaldová kyselina je u kvasinek redukována pomocí NADH-dependentní mevaldátoreduktázy na kyselinu mevalonovou. Dvěma po sobě jdoucími reakcemi kyseliny mevalonové a ATP vzniká isopentenylidifosfát za současné eliminace oxidu uhličitého a vody. Isopentenylidifosfát podléhá vratné isomeraci, čímž vzniká dimethylallyldifosfát. Prodloužení řetězce isopentenylidifosfátu o řetězec dimethylallyldifosfátu za účasti dimethylallyltransferázy vzniká geranylidifosfát. Tato reakce uvolňuje allylový kationt, který následně podléhá adici na dvojnou vazbu isopentenylidifosfátu za uvolnění protonu. Obdobně reaguje geranylidifosfát s isopentenylidifosfátem za vzniku farnesyldifosfátu, který reaguje podobným způsobem reaguje s isopentenylidifosfátem, čímž vzniká geranylgeranylidifosfát [2, 4, 20].

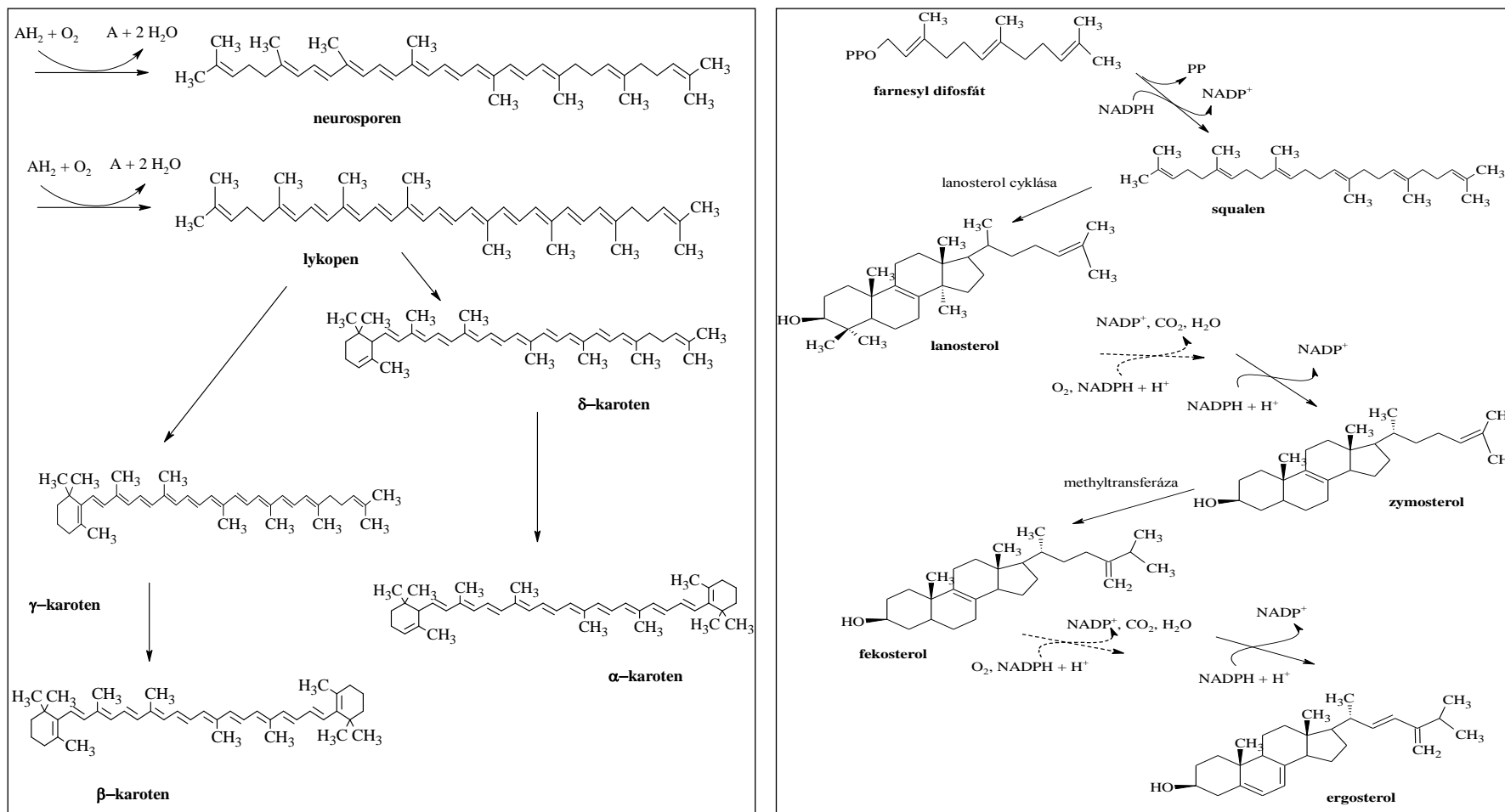
Následnou kondenzací dvou molekul geranylgeranylidifosfátu vzniká molekula fytoenu. Této kondenzace se účastní enzym fytoensyntáza. Fytoen je přímým prekurzorem karotenoidů, je bezbarvý a podléhá řadě desaturačních a cyklizačních reakcí. Produktem těchto reakcí je u kvasinek neurosporen, následně vzniká lykopen, který podléhá cyklizačním reakcím, kdy vznikají dva typy jononových struktur a to β -jononové struktury a α -jononové struktury (biosyntéza karotenoidů je uvedena v obrázku č.11 a obrázku č.12 (vlevo)) [2, 20].

2.2.4.2 Biosyntéza ergosterolu

Ergosterol náleží mezi terpenoidy, proto je jejich biosyntéza z počátku obdobná jako u karotenoidů, tedy metabolismem kyseliny mevalonové. Mezním produktem odlišnosti je farnesyldifosfát. Poté následují kondenzační reakce, které vedou squalen k lanosterolu. Konverzí lanosterolu vzniká zymosterol, který je transportován do mitochondrií, kde je methylován a vzniká fekosterol. Finální konverze fekosterolu na ergosterol probíhá v endoplasmatickém retikulu. Za anaerobních podmínek kvasinky nedokáží syntetizovat a nejsou schopny růst, pokud není ergosterol do média přidán. Tato situace nastává z toho důvodu, že kyslík je nezbytný pro cyklizaci squalenu (biosyntéza ergosterolu je uvedena v obrázku č.12 (vpravo), kde přerušované šipky vyjadřují několik reakčních kroků) [2, 8, 20, 21].



Obrázek 15: (vlevo) biosyntéza karotenoidů do reaktantu isopentenyl difosfátu (vpravo nahoře), který dále reaguje na geranyldifosfát [2, 4, 18]



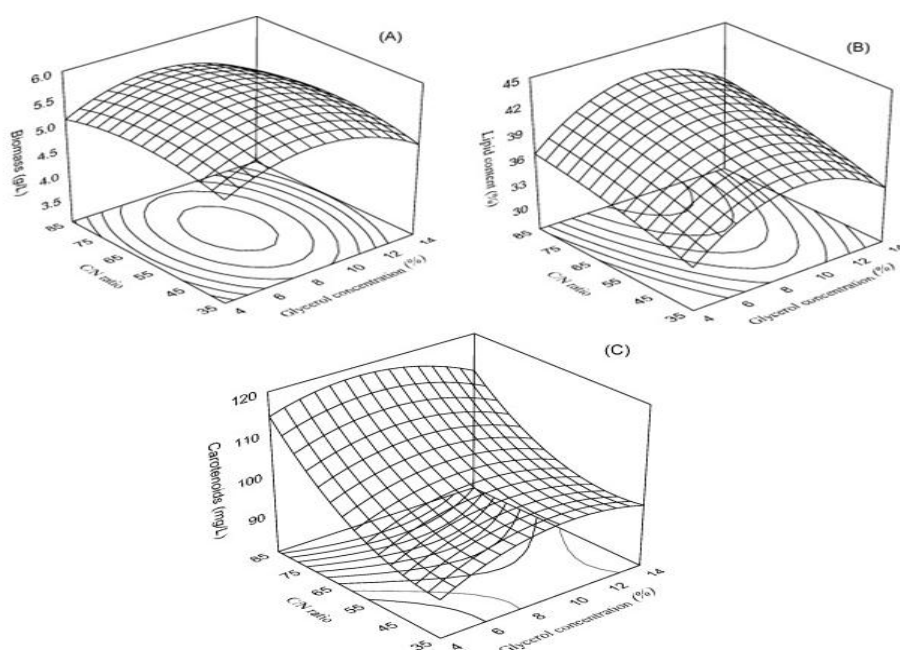
Obrázek 16: vlevo biosyntéza karotenoidů, vpravo biosyntéza ergosterolu od reaktantu farnesyl difosfátu [2,17,18,19]

2.2.5 Nutriční zdroje aktuálně využívané k produkci karotenoidů

Faktory, které ovlivňující efektivní produkci karotenoidů, nebo ovlivňují druh akumulovaného karotenoidu, jsou velmi důležité pro komerční aplikaci v průmyslu. Existuje několik možností, jak ovlivnit mikrobiální produkci karotenoidů. Jednou z možností je změna kultivačních podmínek, čímž může být změna substrátů využívaných jako nutričních zdrojů [22].

2.2.5.1 Potenciální využití kvasinky *Rhodotorula glutinis* pro biokonverzi surového glycerolu z bionafty na lipidy a karotenoidy

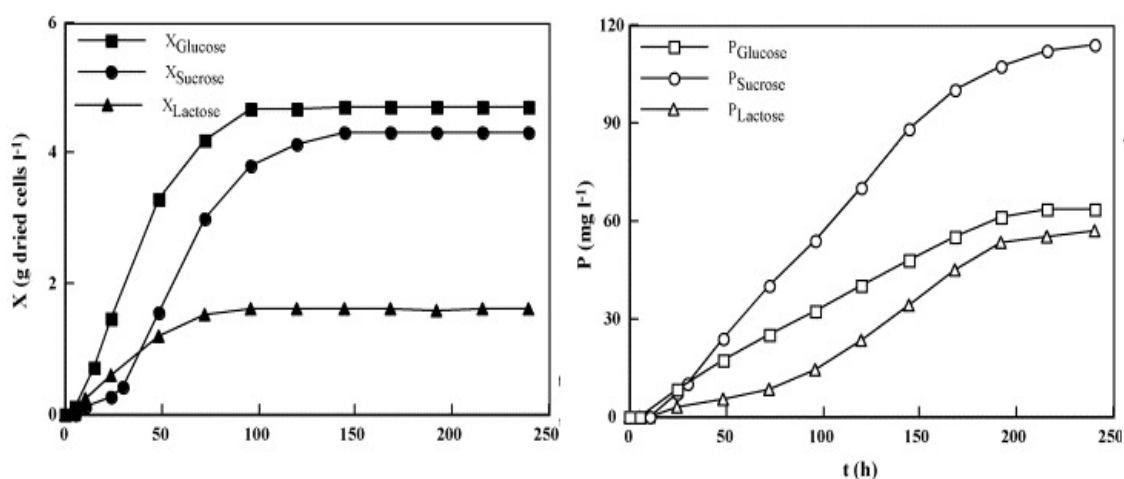
Saengea a kol. zkoušeli využívat surový glycerol získaný jako vedlejší produkt bionafty k produkci lipidů a karotenoidů. K tomuto účelu byla použita kvasinka rodu *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159. Jako zdroj dusíku byla použita povrchově aktivní látka Tween 20, která zvyšuje akumulaci lipidů a karotenoidů. Pomocí metody HPLC bylo zjištěno, že určitý poměr koncentrace uhlíku ku koncentraci dusíku měl příznivý vliv na biomasu, obsah lipidů i produkci karotenoidů. Optimální podmínky pro růst biomasy bylo složení média o 8,5% koncentraci glycerolu a poměru uhlíku k dusíku 60. Pro obsah lipidů a karotenoidů byla optimální koncentrace glycerolu 9,5% a poměr zdrojů uhlíku k dusíku 85 a pro dosažení vyšších výtěžků bylo pH v bioreaktoru upraveno na hodnotu 6. Nejvyšší produkce lipidů $6,05 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a karotenoidů $132,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo dosaženo při fed batch fermentaci. Odpadní produkty z výroby bionafty jsou tedy vhodnou surovinou pro získání kvalitních produktů, jakými jsou lipidy a karotenoidy [23].



Obrázek 17: Vrstevnicové grafy vyjadřující vliv koncentrace glycerolu (x_1) a poměru C / N (x_2) na biomasu (A), obsah tuků (B) a karotenoidů (C), kde byla koncentrace Tween 20 stanovena na $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [23].

2.2.5.2 Produkce karotenoidů kultivací kvasinky kmene *Rhodotorula glutinis* na glukóse, melase a syrovátce jako zdrojů uhlíku

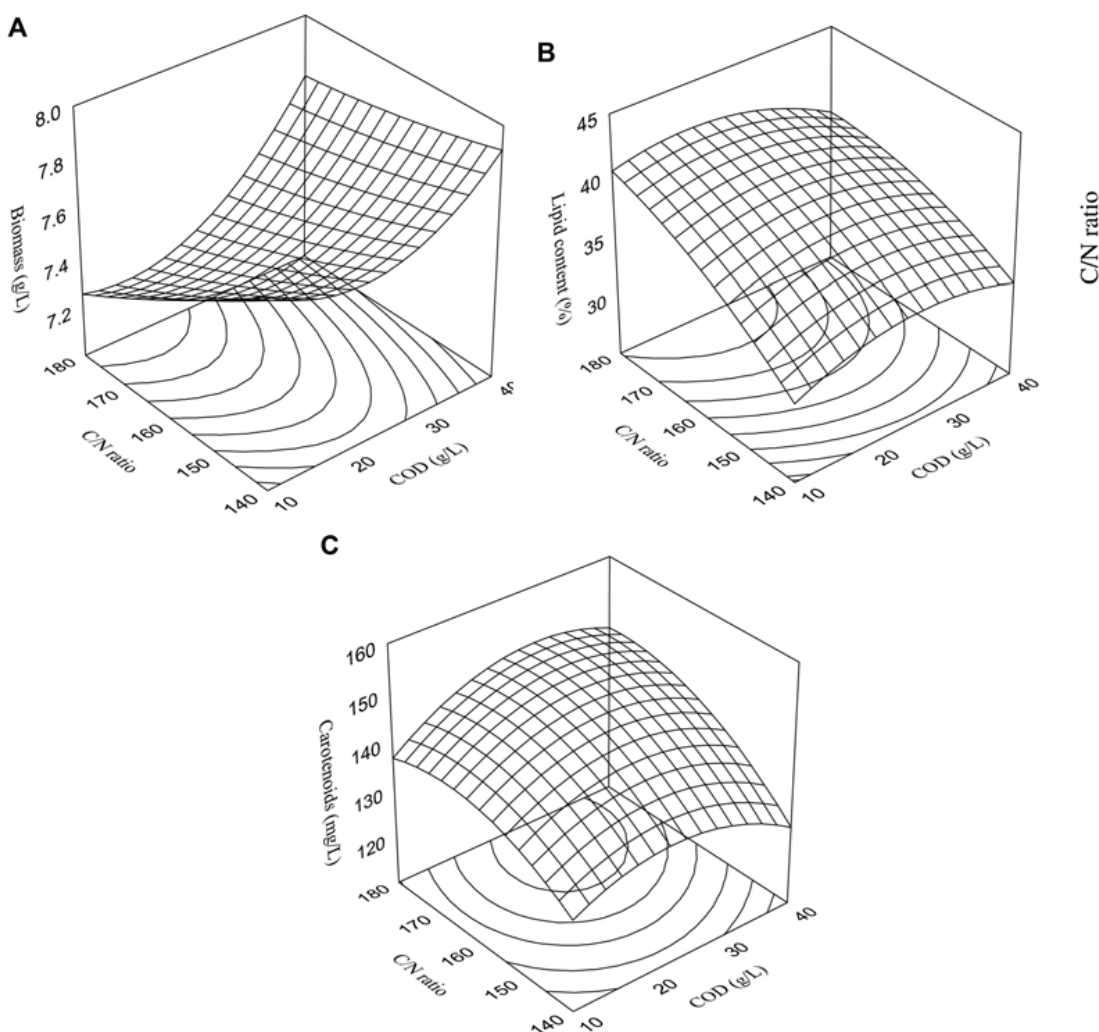
Kvasinky kmene *Rhodotorula glutinis* byly izolovány z odpadních vod rafinérie IPRAS. Aksu a kol. kultivovali tyto kvasinky vsádkovou fermentací. Jako zdroje uhlíku byly použity glukósa, melasa a syrovátka. Pro aktivaci byly přidány bavlníkový olej a Tween 80. Optimální pH kultivace bylo stanoveno na hodnotu 6 a optimální teplota na 30 °C. Výtěžnost karotenoidů se výrazně zvyšuje s rostoucí rychlostí provzdušňování, která dosahuje až 2,4 vvm. Pozitivní vliv na koncentraci karotenoidů má také počáteční koncentrace síranu amonného. Obecně platí, že zvýšení počáteční koncentrace glukózy a melasy zvyšuje růst kvasinek a produkci karotenoidů, zatímco zvýšení počáteční koncentrace syrovátky nevykazuje stejný efekt. Nejvyšší koncentrace karotenoidů ($125,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) byla získána za použití melasy jako zdroje uhlíku o počáteční koncentraci $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, zatímco nejvyšší výnos produktu na základě maximální koncentrace buněk ($35,5 \text{ mg}$ karotenoidů na gram sušiny buněk) bylo dosaženo při použití syrovátky jako zdroje uhlíku v médiu, kde byla koncentrace syrovátky $13,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [24].



Obrázek 18: Křivky produkce karotenoidů a růstu biomasy v závislosti na druhu zdroje uhlíku v médiích (počáteční pH: 6, t: 30 °C, AR: 0 VVM; SR: 100 ot / min) [24].

2.2.5.3 Produkce lipidů a karotenoidů pomocí kvasinky *Rhodotorula glutinis* kultivované v palmovém oleji

Kvasinky *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 byly kultivovány na palmovém oleji z odpadních jádrových vod pouze s přidavkem síranu amonného a Tween 20 jako vhodného zdroje dusíku a povrchově aktivní látky. Poměr koncentrací zdrojů uhlíku k dusíku má významný vliv na metabolismus lipidů a produkci karotenoidů a jeho optimální poměr byl pro nárůst biomasy stanoven na 140, pro vyšší obsah tuků a karotenoidů byl poměr stanoven na 180. Vysoká koncentrace dusíku s nízkým poměrem uhlíku k dusíku vede k nárůstu biomasy, což je pro tvorbu lipidů a karotenoidů nepříznivé. Proto byl zaveden dvoustupňový proces, jehož první fáze byla zaměřena na nárůst biomasy a druhá fáze tohoto procesu byla zaměřena na produkci lipidů a karotenoidů. Výsledkem dvoustupňové kultivace byla vyšší koncentrace lipidů a karotenoidů, než u jednostupňové kultivace [25].



Obrázek 19: Vrstevnicové grafy znázorňující účinky chemické spotřeby kyslíku (COD) (x_1) a poměr C / N (x_2) a jejich účinky na biomasu (A), obsah tuků (B) a obsah karotenoidů (C), koncentrace Tween 20 byla stanovena na $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [25].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce zaměřené na produkci karotenoidních pigmentů s využitím odpadních lipidických substrátů a glycerolu je řešení následujících dílčích úloh:

- Přehled kvasinkovitých producentů karotenoidů a přehled využitelných typů substrátů jako nutričních zdrojů.
- Optimalizace metod kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních lipidických substrátech a glycerolu, stanovení aktivit lipázy.
- Sledování produkce karotenoidů kvasinkami s využitím odpadních lipidů a glycerolu jako zdroje uhlíku

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Tabulka 1: Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek

Kultivace kvasinek	
chemikálie	výrobce
Kvasničný autolyzát	Himedia (India)
D-glukóza monohydrát p.a	Lach-Ner s. r.o. (ČR)
Síran amonný p.a.,	Lachema (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	Lachema (ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a.	Chemapol (ČR)
Chlorid sodný p.a.	Lachema (ČR)
Glycerin p.a.	Lach-Ner s. r.o. (ČR)
Řepkový olej	Sk-oil

Tabulka 2: Chemikálie použité pro izolaci karotenoidů

Izolace karotenoidů	
chemikálie	výrobce
Aceton p.a.,	Lachema (ČR)
Hydroxid draselný p.a.	Lachema (ČR)
Diethyléter p.a.	Lachema (ČR)
Ethanol pro UV-VIS	Lachema (ČR)

Tabulka 3: Chemikálie použité pro HPLC stanovení

HPLC	
chemikálie	výrobce
Methanol pro HPLC Gradient Grade, Sigma	Aldrich (SRN)
Ethanol pro HPLC Gradient Grade, Sigma	Aldrich (SRN)

4.2 Přístroje a pomůcky

Tabulka 4: Přístroje a pomůcky použité při kultivaci kvasinek

Kultivace kvasinek	
Přístroje a pomůcky	výrobce
Spektrofotometer VIS, Helios δ ,	Unicam (UK)
Mikroskop L II ooA,	Intraco Micro (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera	GKB Color Digital (Taiwan)
Lucia Image active 5.0,	Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)
Třepačka IKA Yellow Line, (SRN)	Yellow Line (SRN)
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen	Laborzentrifugen (SRN)
Analytické váhy Boeco (SRN)	Boeco (SRN)

Tabulka 5: Použité přístroje a pomůcky k izolaci a stanovení karotenoidů

Izolace a analýza karotenoidů	
Přístroje a pomůcky	výrobce
Filtry pro HPLC, PRE-CUT	Alltech (GB)
Vakuová odparka RV 06	IKA (SRN)
Vodní lázeň EL-20	Merci a.s. (ČR)
Soustava HPLC/UV-VIS	ECOM spol. s r.o. (ČR)
Programátor gradientu GR 5	ECOM spol. s r.o. (ČR)
Vysokotlaké čerpadlo typ P 4020	ECOM spol. s r.o. (ČR)
Dávkovací ventil typ C	ECOM spol. s r.o. (ČR)
Termostat kolony typ LCO 101	ECOM spol. s r.o. (ČR)
UV-VIS procesorový detektor, typ LCD 2084	ECOM spol. s r.o. (ČR)
Software Clarity – chromatography SW	Data apex 2006
Kolona Kinetex C18, 2,6 μ m, 4,6 x 150 mm,	Phenomenex
Držák předkolony - KJO - 4282	Supelco

Tabulka 6: Kvasinkovité kmeny

Kvasinkovité kmeny	
<i>Rhodotorula glutinis</i> - CCY 20-2-33	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> - CCY 10-1-1
<i>Rhodotorula rubra</i> - CCY 20-7-31	<i>Sporobolomyces roseus</i> - CCY 19-6-4
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> - CCY 20-9-7	<i>Sporobolomyces shibatanus</i> - CCY 19-20-3

4.3 Postupy práce

4.3.1 Kultivace mikroorganismů

4.3.1.1 Kultivace karotenogenních kmenů

Karotenogenní kvasinky patří mezi mezofilní aerobní mikroorganismy, které mají ve většině případů podobné nároky. Kmeny kvasinek *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus* byly kultivovány v tekutém médiu při teplotě 28 °C, za stálého osvětlení a protřepávání. Média byla sterilizována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Kultivace probíhaly na olejovém nebo glycerolovém substrátu.

4.3.2 Kultivace na oleji

4.3.2.1 Inokulum I

Pro každý druh kvasinek bylo připraveno jedno inokulum I o složení uvedeném v tabulce 7. Vysterilované inokulum bylo zaočkováno třemi kličkami zásobní kultury uchovávané na Petriho miskách. Kultivace probíhala 24 hodin v 50 ml inokula I.

Tabulka 7: Složení inokula I

Inokulum I	
Složka	množství (g)
glukóza	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄	0,34
Kvasničný autolyzát	7
Vodovodní voda	1000 (ml)

4.3.2.2 Inokulum II

Pro každý druh kvasinky byly po kultivaci v inokulu I připraveny dvě série inokula II, lišící se ve složení, které je uvedeno v tabulce 8. Do sterilního inokula II (125 ml) byly přeočkovány kultury kultivované v inokulu I. Následná kultivace na sériích A a B inokula II probíhala 24 hodin.

Tabulka 8: Tabulka udávající složení dvou sérií inokula II - sérii A i B

Inokulum II	série A/kontrola	série B
Složka	množství (g)	množství (g)
glukóza	40	20
řepkový olej		20
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5
KH ₂ PO ₄	5	5
MgSO ₄	0,34	0,34
Kvasničný autolýzát	7	7
Vodovodní voda	1000 (ml)	1000 (ml)

4.3.2.3 Produkční médium

Pro každou sérii inokula II byly připraveny dvě série sterilních produkčních médií, kam byly přeočkovány kultury z obou sérií inokula II. Složení dvou sérií A a B produkčního média je uvedeno v tabulce 9. Kultivace probíhala následujících 80 hodin ve 125 ml tohoto média.

Tabulka 9: složení produkčního média série A i B

Produkční médium	kontrola	série A /série B
Složka	množství (g)	množství (g)
glukóza	30	
řepkový olej		30
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	4
KH ₂ PO ₄	4	4
MgSO ₄	0,34	0,34
Vodovodní voda	1000 (ml)	1000 (ml)

4.3.3 Kultivace na glycerolu

4.3.3.1 Inokulum I

Inokulum I bylo připraveno obdobně jako inokulum I (50 ml) v kultivaci na oleji a taktéž byly stejným způsobem zaočkovány všechny zmíněné kmeny kvasinek. Složení inokula I (50 ml) je uvedeno v tabulce 7. Kultivace probíhala 24 hodin.

4.3.3.2 Inokulum II

Pro každý druh kvasinek byly připraveny dvě série inokula II - série A a B, jejichž složení je uvedeno v tabulce 10. Do každé série inokula II (250 ml) byly přeočkovány za sterilních podmínek druhy kvasinek z inokula I. Následná kultivace probíhala 24 hodin.

Tabulka 10: složení dvou sérií inokula II

Inokulum II	série A	série B
Složka	množství (g)	množství (g)
glukóza	40	20
glycerol		20
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5
KH ₂ PO ₄	5	5
MgSO ₄	0,34	0,34
Kvasničný autolyzát	7	7
Vodovodní voda	1000 (ml)	1000 (ml)

4.3.3.3 Produkční médium

Produkční médium bylo připraveno tak, že pro každou sérii A a B byly připraveny tři různá produkční média o složení uvedeném v tabulce 11. Produkční média jsou shodná v sérii A i v sérii B. Do těchto tří médií v každé sérii A a B byly za sterilních podmínek přeočkovány všechny kmeny kvasinek a jejich následná kultivace trvala 80 hodin. Objem produkčního média činil 125 ml.

Tabulka 11: složení tří typů produkčních médií série A i B

Produkční médium	série A/ série B		
	glukósové	glukosa/glycerol	glycerol
Složka	množství (g)	množství (g)	množství (g)
glukóza	30	15	
glycerol		15	30
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	4	4
KH ₂ PO ₄	4	4	4
MgSO ₄	0,34	0,34	0,34
Vodovodní voda	1000 (ml)	1000 (ml)	1000 (ml)

4.3.4 Stanovení množství biomasy

Množství biomasy bylo stanoveno na základě kalibračních křivek, které vyjadřují závislost mezi množstvím sušiny a zákalu různě koncentrovaných suspenzí kvasinek. Pro výpočet množství biomasy byly použity kalibrační křivky uvedené v rovnicích (1-6):

$$\textit{Rhodotorula glutinis}: y = 0,1974x - 0,0234 \quad (1)$$

$$\textit{Rhodotorula aurantiaca}: y = 0,2047x - 0,0184 \quad (2)$$

$$\textit{Rhodotorula rubra}: y = 0,2290x - 0,0000 \quad (3)$$

$$\textit{Cystofilobasidium capitatum}: y = 0,1669x - 0,1884 \quad (4)$$

$$\textit{Sporobolomyces roseus}: y = 0,2421x - 0,0488 \quad (5)$$

$$\textit{Sporobolomyces shibatanus}: y = 0,2047x - 0,0184 \quad (6)$$

Kde x je množství sušiny $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a y vyjadřuje naměřenou absorbanci.

1 cm^3 vzorku byl naředěn destilovanou vodou tak, aby nepřekročil rozsah spektrofotometru. Absorbance byla měřena při vlnové délce 630 nm [26, 27].

4.3.5 Stanovení aktivity lipázy

Stanovení aktivity lipázy bylo provedeno spektrofotometricky. Jako substrát byl použit p-nitrofenyllaurát. Stanovení lipázy bylo provedeno na médiích kvasinek kultivovaných na oleji.

Lipázový substrát byl připraven ve 100 ml baňce, kde bylo rozpuštěno 0,017 g SDS (dodecyl sulfonát sodný), 1 g Tritonu X-100 a 0,0135 g p-nitrofenol laurátu. Vzniklá směs byla následně zahřívána po dobu 15 minut při 65 °C.

Vzorky pro měření lipázové aktivity byly připraveny smícháním 2,5 ml fosfátového pufru, 2,5 ml p-nitrofenolu a 1 ml supernatantu (médiu zbavené buněk). Ihned po přidání média jako supernatantu byla měřena absorbance při vlnové délce 410 nm po uplynutí 30 minut bylo měření opakováno. Na základě rozdílů konečných a počátečních hodnot absorbancí, byl zjištěn rozdíl koncentrací substrátu podle kalibrační křivky uvedené v rovnici (7):

$$y = 12,3303x - 0,0017 \quad (7)$$

kde y je změna naměřené absorbance ΔA a x je koncentrací substrátu.

Aktivita lipázy byla vypočítána podle vztahu uvedeného v rovnici (8):

$$EA = \frac{\Delta c}{\Delta t} \cdot R \quad (8)$$

kde EA je aktivita lipázy ($\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$), Δc je koncentrací substrátu ($\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$), Δt je změna času (v minutách) a R je koeficient ředění vzorku [28].

4.3.6 Mikroskopické pozorování buněk

Pro posouzení morfologie buněk a pro případné vyloučení nežádoucí kontaminace kvasinek byly kultury pozorovány pod mikroskopem. Kapka buněčné suspenze byla přenesena na podložní sklíčko, překryta krycím sklíčkem a kvasinky byly následně pozorovány pod mikroskopem při zvětšení 400x. Výsledky byly zachyceny digitální kamerou a zpracovány pomocí počítačového softwaru Lucia.

4.3.7 Zpracování biomasy

Celý objem produkčního média byl centrifugovaný při 5000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Následně byly buňky promyty destilovanou vodou a opětovně stáčeny stejným způsobem jako dříve. Na závěr byla biomasa rozsuspendovaná ve fyziologickém roztoku a uložena v mrazničce.

4.3.8 Izolace karotenoidů a ergosterolu zmýdlením

Součástí lipidické frakce kvasinkovitých buněk jsou jak karotenoidy, tak i ergosterol. Z tohoto důvodu je možné je izolovat zmýdlením a posléze několikanásobnou extrakcí. Vzorky uložené v mrazáku byly po tmě rozmražené a zcentrifugované při 5000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Po promytí destilovanou vodou byly kvasinky opět stejným způsobem odstředěny a izolovaný sediment kvasinkových buněk byl dezintegrován ve třecí misce v 50 ml acetonu. Po kvantitativním převodu suspenze na odpařovací misku. K suspenzi v odpařovací misce bylo přidáno 50 ml 10% alkoholického roztoku KOH. Takto připravená suspenze byla zmýdlena na vodní lázni při 90 °C po dobu 30 minut.

4.3.9 Extrakce

Zmýdlená suspenze byla třikrát extrahovaná v diethylétheru. Spojené éterové frakce byly odpařené na vakuové odparce.

4.3.10 Úprava vzorků pro HPLC

Odparky vzorků, získané po extrakci byly rozpuštěny ve 2 ml etanolu pro HPLC, přefiltrovány přes jednorázový filtr a převedeny do mikrocentrifugační zkumavky. Následně byly vzorky odstředěny na mikrocentrifuze po dobu 15 minut při 15000. Po purifikaci byly vzorky uchovávány v mrazničce ve tmě při -20 °C pro případné další analýzy.

4.3.11 Analýza karotenoidů pomocí HPLC

Analýza karotenoidů a ergosterolu metodou HPLC probíhala za izokratických podmínek při průtoku $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ mobilní fáze a teplotě 45 °C na nerezové koloně s předkolonou. Současně probíhala fotometrická detekce při vlnové délce 450 nm, což je vlnová délka odpovídající maximu absorpce karotenoidů a při vlnové délce 285 nm, odpovídající maximu absorpce ergosterolu. Vzorek o objemu 10-20 μl byl dávkován přes dávkovací ventil. Jako mobilní fáze byl použit methanol pro HPLC. Karotenoidy i ergosterol byly analyzovány na soustavě HPLC od firmy ECOM spol. s r.o..

Pro vyhodnocení analytických dat byl použit program, který snímal odezvu fotometrického detektoru Clarity – Chromatography SW, Data Apex 2006.

4.3.12 Identifikace a kvantifikace karotenoidů

Na základě chromatografické analýzy standardů karotenoidů a ergosterolu při již zmíněných vlnových délkách (viz předchozí) byla provedena identifikace a kvantifikace obsahu jednotlivých vzorků. Stanovení množství vybraných karotenoidů a ergosterolu bylo provedeno na základě kalibračních křivek uvedených v rovnicích (9-11):

$$\beta\text{-karoten} : y = 4,3875x \quad (9)$$

$$\text{lykopen} : y = 1,0248x \quad (10)$$

$$\text{ergosterol} : y = 31,6420x \quad (11)$$

Ke kvantitativnímu vyhodnocení byla použita závislost plochy píku jednotlivých standardů na koncentraci [26].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1.1 Kultivace na oleji

5.1.1.1 Pozorování morfologických změn používaných kmenů v závislosti na složení médií

Kultivace na řepkovém oleji proběhla u kmenů *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus*. Všechny kmeny byly kultivovány za stejných podmínek a jako zdroj živin využívaly substráty o stejném složení, tedy kontrolní médium obsahovalo glukosu a média v sériích A a B obsahovaly olej jako zdroj uhlíku. Tyto série se liší na základě složení inokula II, které v sérii A obsahovalo jako zdroj uhlíku glukosu a v sérii B byly jako zdroje uhlíku zastoupeny jak glukosa, tak olej v poměru 1:1.



Obrázek 20: morfologie kmene *Rhodotorula glutinis* kultivované na glukose (RG kontrola) ve srovnání sérií A a B kultivovaných na oleji

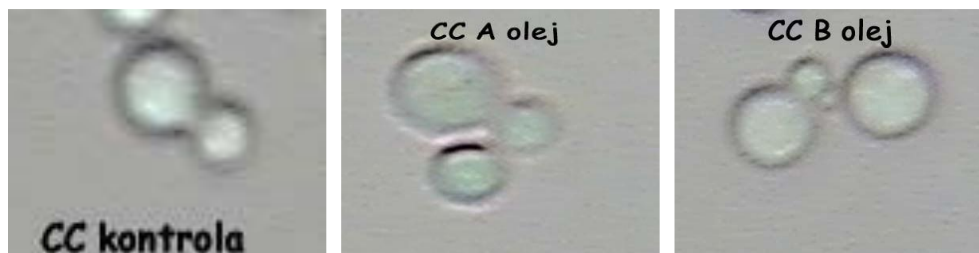


Obrázek 21: Morfologie kmene *Rhodotorula aurantiaca* kultivované na glukose (RA kontrola) ve srovnání sérií A a B kultivovaných na oleji



Obrázek 22: Morfologie kmene *Rhodotorula rubra* kultivované na glukose

se (RR kontrola) ve srovnání sérií A a B kultivovaných na oleji



Obrázek 23: Morfologie kmene *Cystofilobasidium capitatum* kultivované na glukose (CC kontrola) ve srovnání sérií A a B kultivovaných na oleji



Obrázek 24: Morfologie kmene *Sporobolomyces roseus* kultivované na glukose (SR kontrola) ve srovnání sérií A a B kultivovaných na oleji



Obrázek 25: Morfologie kmene *Sporobolomyces Shibatanus* kultivované na glukose (SSc kontrola) ve srovnání sérií A a B kultivovaných na oleji

Na základě mikroskopického pozorování lze vidět reakci buněk na složení média. Tvary buněk ve všech kmenech a většině sérií nevykazovaly žádné morfologické zvláštnosti. U kmene *Rhodotorula glutinis* v sérii B vykazovaly buňky spíše oválný tvar. (viz obrázek 20). U kmene *Rhodotorula aurantiaca* byly změny ve tvaru buněk pouze v sérii B, kde nabývaly kulatého až mírně oválného tvaru. Obrázek 22 znázorňuje tvar buněk kmene *Rhodotorula rubra* v sérii A, B a v kontrole, kde byl tvar buněk spíše kulovitý, v sérii A oválný až kulovitý a v sérii B měly buňky opět tvar spíše kulovitý. V kultuře kontroly a v kultuře série B jsou také mírně patrné pigmenty nacházející se na vnitřní straně cytoplasmatické membrány. Obrázek 23 zachycuje tvar buněk kmene *Cystofilobasidium capitatum* v sérii A, B a v kontrole. Tvar buněk jak v kontrolním médiu, tak v sériích A a B kulovitý. Na obrázku 24 je viditelné, že buňky kmene *Sporobolomyces roseus* mají na glukosovém médiu vejcovitě protáhlý tvar. Tvary kvasinkovitých buněk série A a B mají spíše citrónovitý tvar a je zde patrné, že kultivace na olejovém médiu v sérii A i B byla pro tento kmen jistým stresujícím prostředím. Kmen

Sporobolomyces shibatanus nereagoval na olejové médium z pohledu změny tvaru buněk a jeho buňky měly tvar buněk v sériích A a B stejný, tedy kulovitý tvar jako na glukósovém médiu.



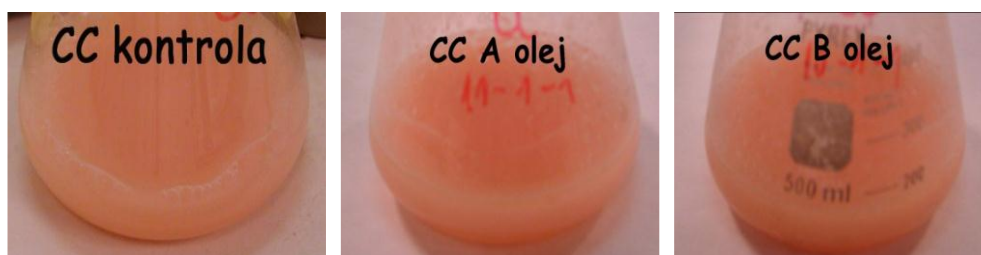
Obrázek 26: Změny zbarvení kmene *Rhodotorula glutinis* kultivovaného na glukóse (RG kontrola) ve srovnání se sérií A a B kultivovaných na oleji.



Obrázek 27: Změny zbarvení kmene *Rhodotorula aurantiaca* kultivovaného na glukóse (RA kontrola) ve srovnání se sérií A a B kultivovaných na oleji.



Obrázek 28: Změny zbarvení kmene *Rhodotorula rubra* kultivovaného na glukóse (RR kontrola) ve srovnání se sérií A a B kultivovaných na oleji.



Obrázek 29: Změny zbarvení kmene *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaného na glukose (RA kontrola) ve srovnání se sérií A a B kultivovaných na oleji.



Obrázek 30: Změny zbarvení kmene *Sporobolomyces roseus* kultivovaného na glukose (RA kontrola) ve srovnání se sérií A a B kultivovaných na oleji.



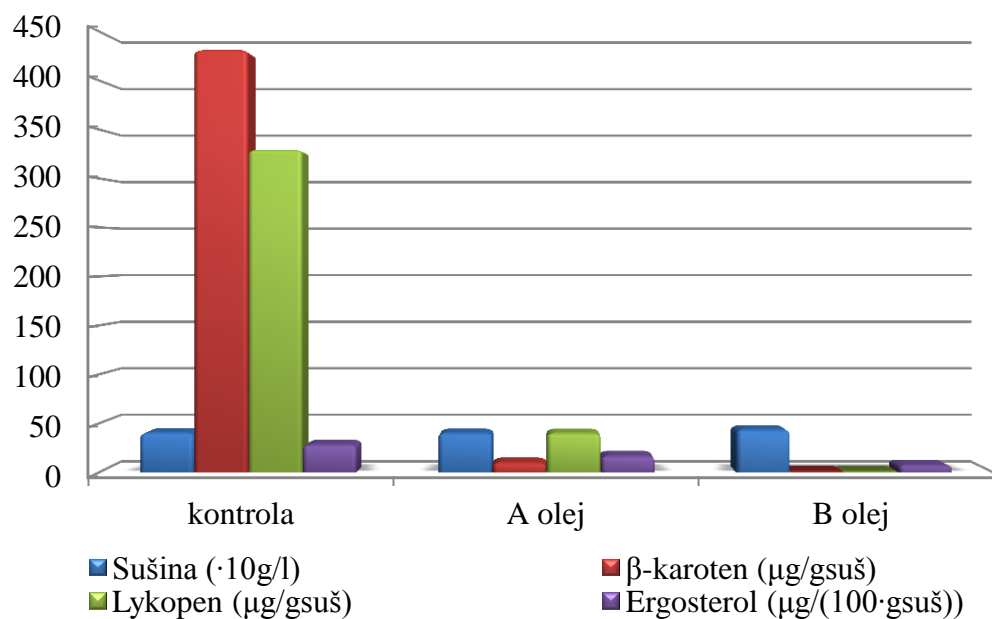
Obrázek 31: Změny zbarvení kmene *Sporobolomyces shibatanus* kultivovaného na glukose (RA kontrola) ve srovnání se sérií A a B kultivovaných na oleji.

Zbarvení jednotlivých kmenů na použitých médiích bylo zachyceno na obrázcích 26 -31. U většiny kmenů bylo zbarvení sérií A a B spíše růžovo-oranžové ve srovnání s kontrolní kulturou, která byla zbarvena ve většině případů oranžově. Výrazné změny zbarvení mezi sériemi A a B lze vidět u kmene *Rhodotorula rubra*, u kterého je série B zbarvena velmi světle oranžově (viz obrázek 28) a u kmene *Sporobolomyces shibatanus* měl naopak zbarvení série A světle oranžové (viz obrázek 30).

5.1.1.2 Produkce karotenoidů kultivovanými kmeny v závislosti na složení média

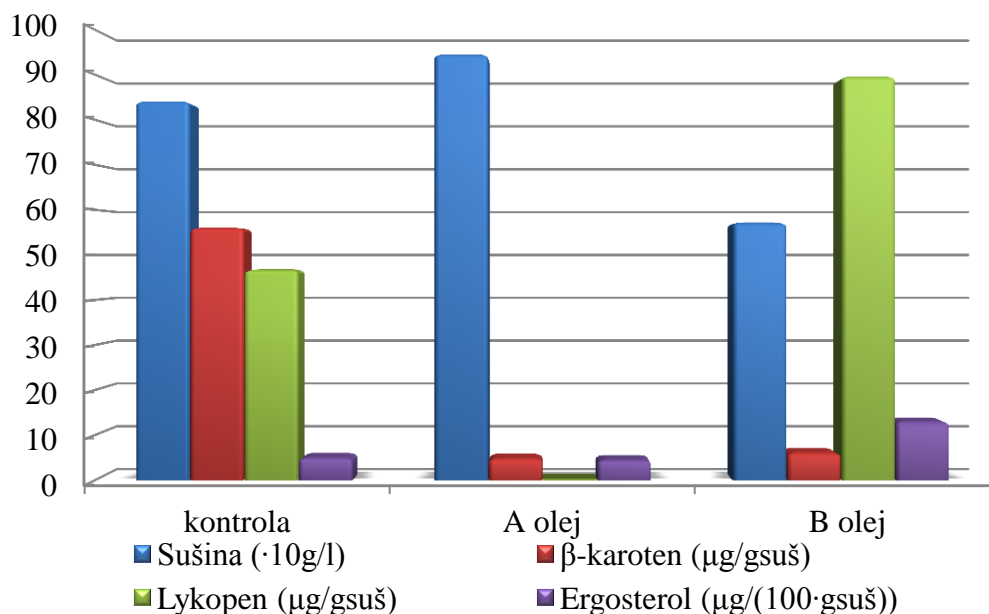
U každého kmene byla provedena identifikace a kvantifikace karotenoidů pomocí metody HPLC jejíž vyhodnocení je patrné v grafech u každého kmene - viz následující. Přehled naměřených dat nárůstu biomasy, obsahu karotenoidů a ergosterolu je uveden v tabulce 12.

Rhodotorula glutinis



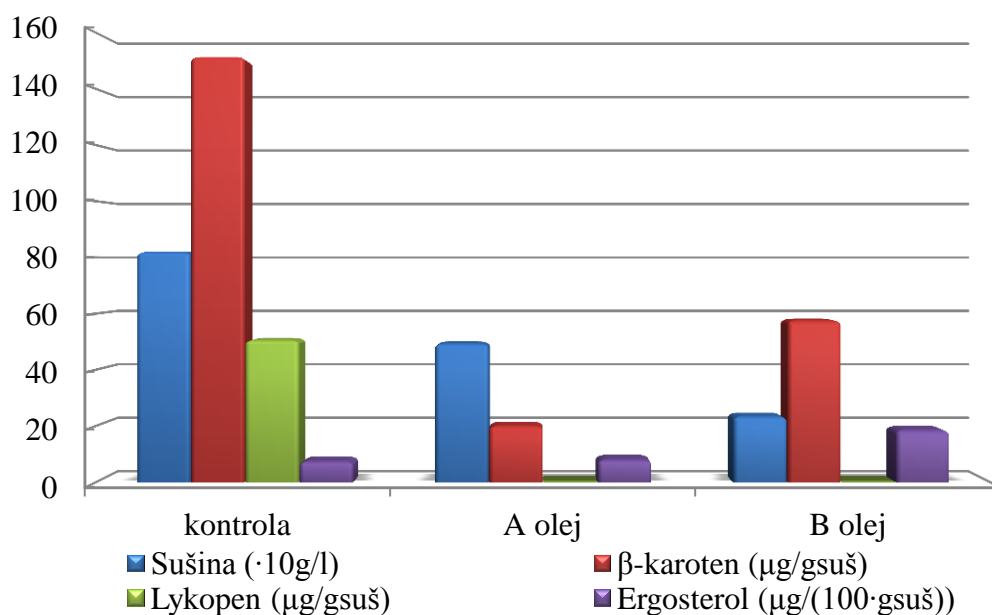
Obrázek 32: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Rhodotorula glutinis* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Rhodotorula aurantiaca



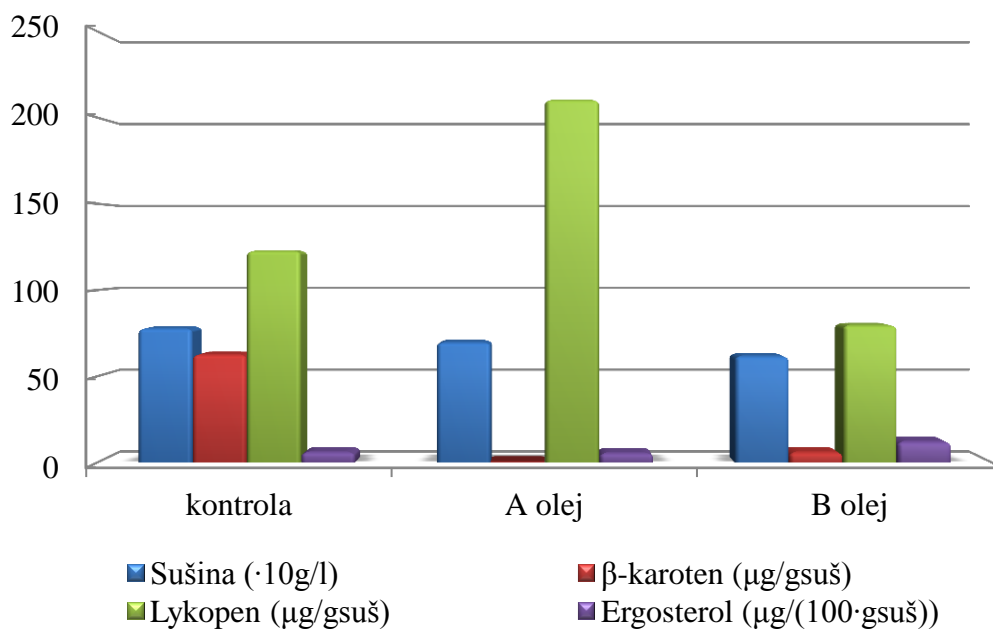
Obrázek 33: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Rhodotorula aurantiaca* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Rhodotorula rubra



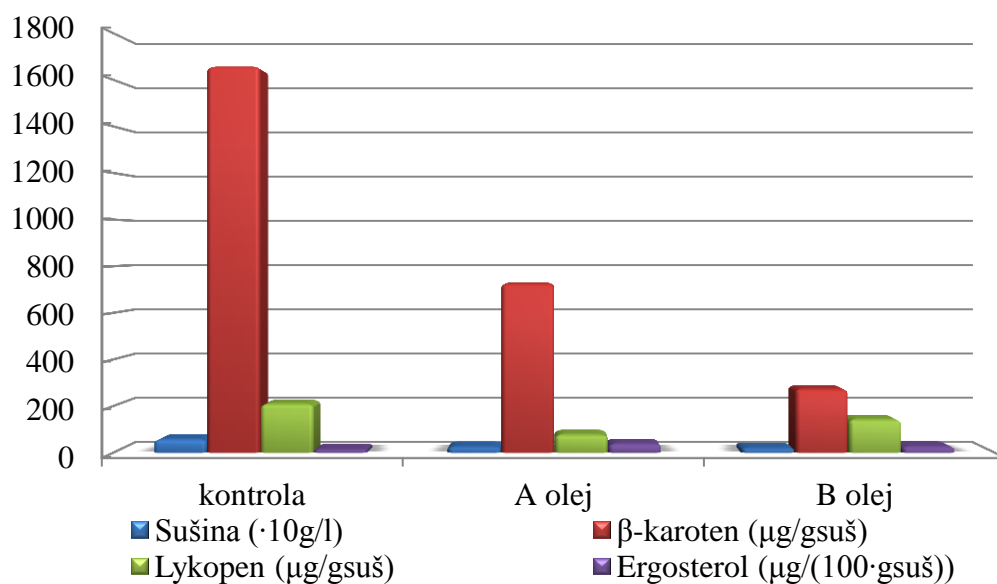
Obrázek 34: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Rhodotorula rubra* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Cystofilobasidium capitatum



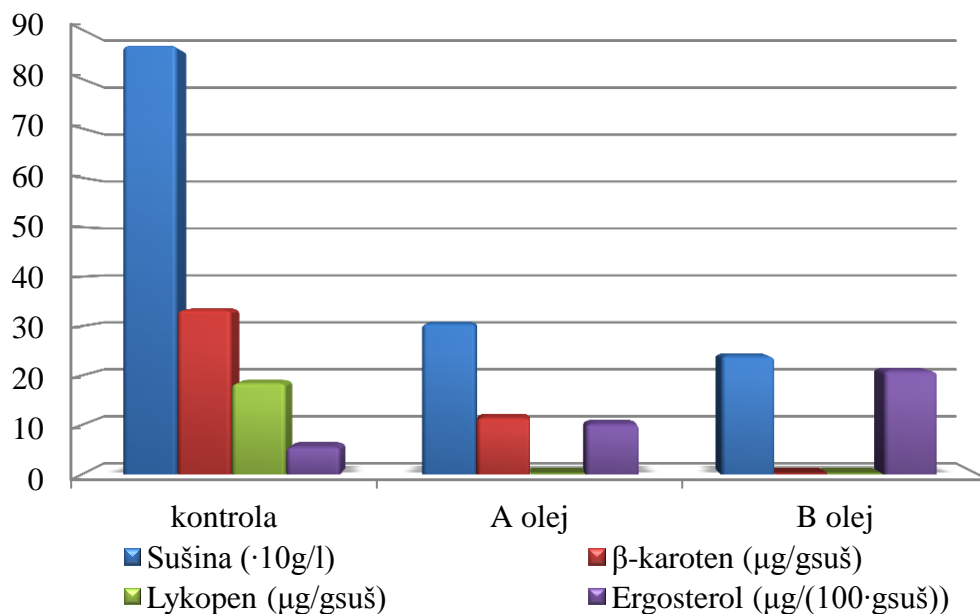
Obrázek 35: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Cystofilobasidium capitatum* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Sporobolomyces roseus



Obrázek 36: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Sporobolomyces roseus* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Sporobolomyces shibatanus



Obrázek 37: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Sporobolomyces shibatanus* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

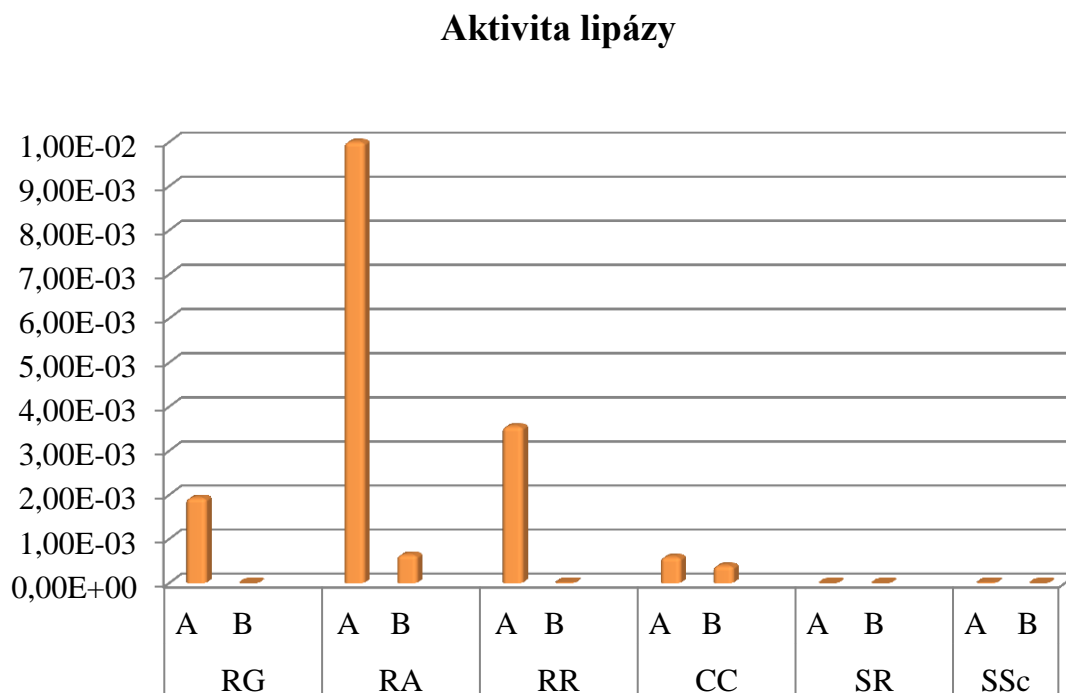
Z grafů je patrné, že nejvyšší nárůst biomasy v porovnání s kontrolní kulturou byl u kmene *Rhodotorula aurantiaca* v sérii A ($9,469 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), kde byla tato koncentrace téměř o 9 % vyšší než u kontroly. Ergosterol byl nejvíce produkován kmeny kvasinek *Sporobolomyces roseus*, který vykazoval největší produkci ergosterolu ze všech kmenů a to v sérii A, kde byla produkce až téměř 2,5x vyšší ($3\,961,661 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a také v sérii B, kdy byla produkce ergosterolu téměř dvojnásobná vůči kontrole ($2\,799.863 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Z hlediska produkce lykopenu byl jako nejlepší producent shledán kmen *Cystofilobasidium capitatum* u něhož byla zaznamenána 70 % nadprodukce vůči kontrole ($210,835 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). U produkce β -karotenu bylo zaznamenáno nejvyšší množství u kmene *Sporobolomyces roseus*, avšak vůči kontrole byla tato hodnota téměř 2x menší.

Z hlediska produkce karotenoidů je použití olejového substrátu významné pouze u kmene *Cystofilobasidium capitatum*. Z hlediska výtěžnosti ergosterolu je však tato metoda velmi účinná. Jako nejlepší producent ergosterolu, lykopenu i β -karotenu byl shledán kmen *Sporobolomyces roseus*, dále byla nadprodukce ergosterolu zaznamenána také u kmenů *Rhodotorula glutinis* (série A), *Rhodotorula aurantiaca* (série B), *Rhodotorula rubra* (série B), *Cystofilobasidium capitatum* (série B). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12.

Je třeba doplnit, že v předložené práci nebyly hodnoceny všechny hlavní karotenoidní pigmenty kvasinek, a to z důvodu nedostupnosti standardů. Je možné, že s lykopemem dochází i ke koeluci torulenu, podle tvaru chromatoramů lze předpokládat i produkci torularhodinu a jeho derivátů (retenční časy 3,3 – 6 min). Při kultivaci na olejovém médiu došlo rovněž k významné změně produkce atypických oxidovaných pigmentů neznámé struktury, které byly eluovány v průběhu prvních 2-3 minut a které zřejmě ovlivňovaly výsledné neobvyklé zbarvení kultur. Identifikace by vyžadovala detailní analýzu pomocí LC/MS technik.

5.1.1.3 Stanovení aktivity lipázy

Aktivita lipázy byla sledována u všech kvasinkovitých kmenů kultivovaných na oleji. Z naměřených dat uvedených v tabulce 12 vyplývá, že nejvyšší aktivitu lipázy prokázal kmen *Rhodotorula aurantiaca* v sérii A, dále *Rhodotorula rubra* a *Rhodotorula glutinis* u ostatních kmenů byla také prokázána aktivita lipázy, ale u některých kmenů, některých sérií bylo měření neprůkazné. Výsledky jsou graficky zpracovány v následujícím grafu (viz obrázek 38).



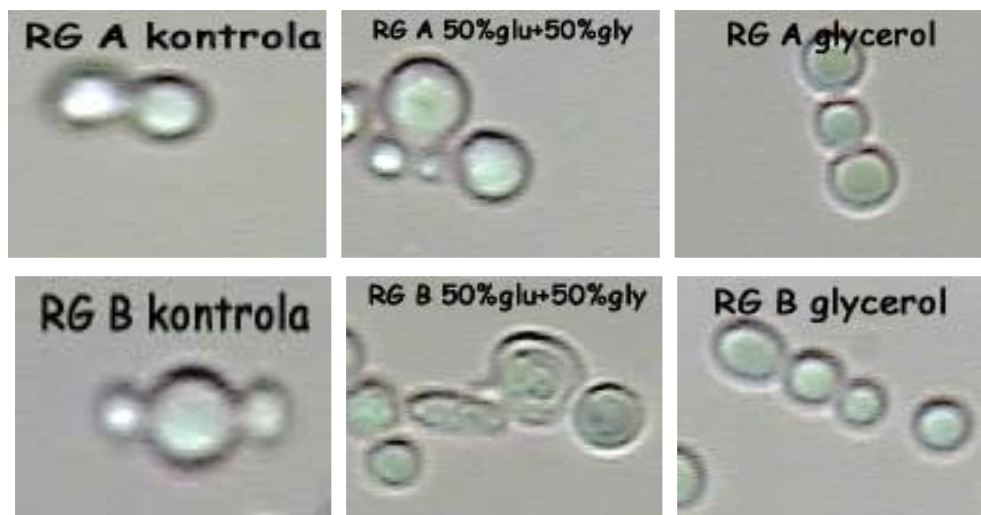
Obrázek 38: Graf zaznamenávající aktivity jednotlivých kmenů v sériích médií A a B.

Aktivita lipázy byla u většiny kmenů poměrně nízká a její produkce poměrně dobře odpovídá schopnosti jednotlivých kmenů růst a produkovat pigmenty na olejovém médiu. Za použitých kultivačních podmínek ve výše popsáných screeningových experimentech byly jako kmeny potenciálně použitelné ke kultivaci na lipidech označeny *Cystofilobasidium capitatum* a v menší míře všechny kmeny rodu *Rhodotorula*. Kultivační podmínky by se však musely dále optimalizovat.

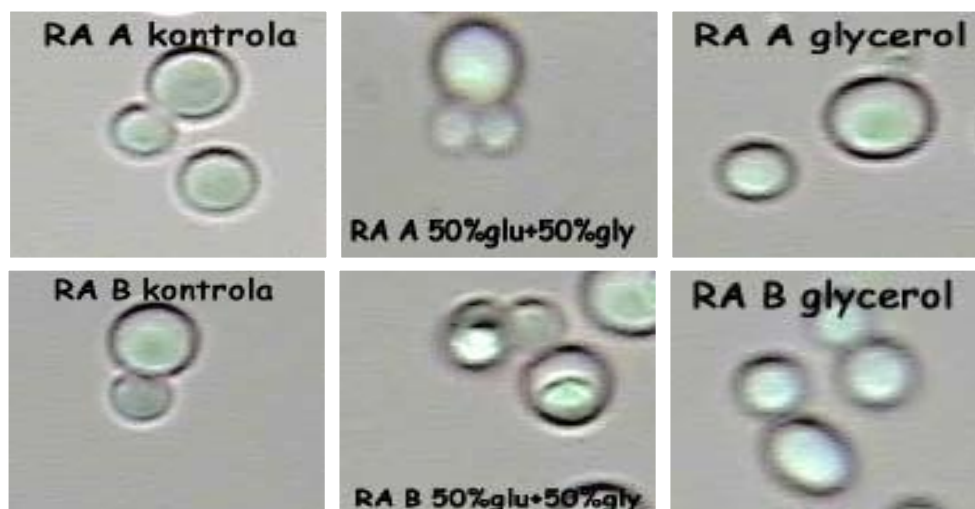
5.1.2 Kultivace na glycerolu

5.1.2.1 Pozorování změny morfologických vlastností

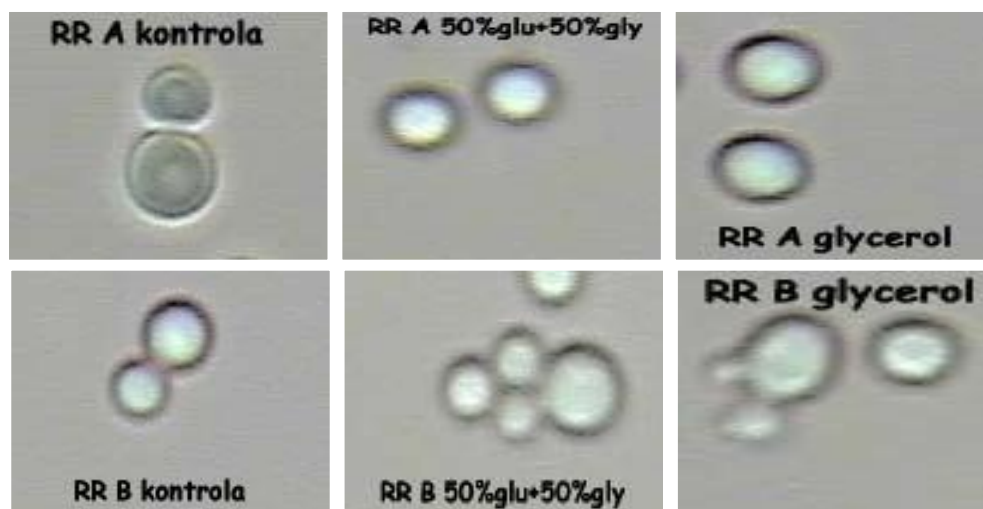
Kultivace na glycerolu byla provedena u kmenů *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus*. Všechny kmeny byly kultivovány za stejných podmínek a jako zdroj živin využívaly substráty o stejném složení, tedy kontrolní médium obsahovalo vždy glukosu, a to v sériích A i B. Tyto série se liší ve složení inokula II, které v sérii A obsahovalo jako zdroj uhlíku glukósu a v sérii B byly jako zdroje uhlíku zastoupeny jak glukosa, tak glycerol v poměru 1:1. Dále byla provedena kultivace obou sérií na médiu s obsahem glukosy a glycerolu v poměru 1:1 a na médiu s čistým glycerolem.



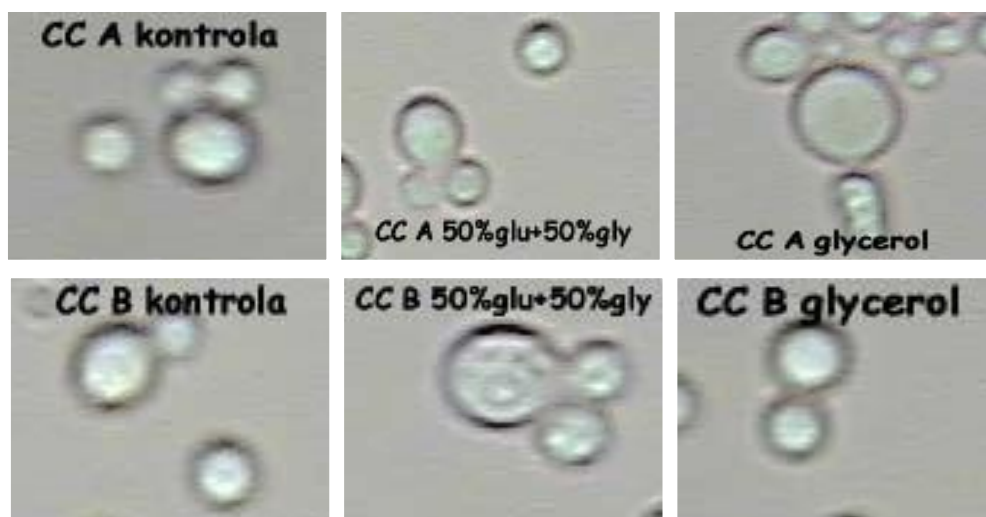
Obrázek 39: Obrázek buněk kmene *Rhodotorula glutinis* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (RG A/B kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.



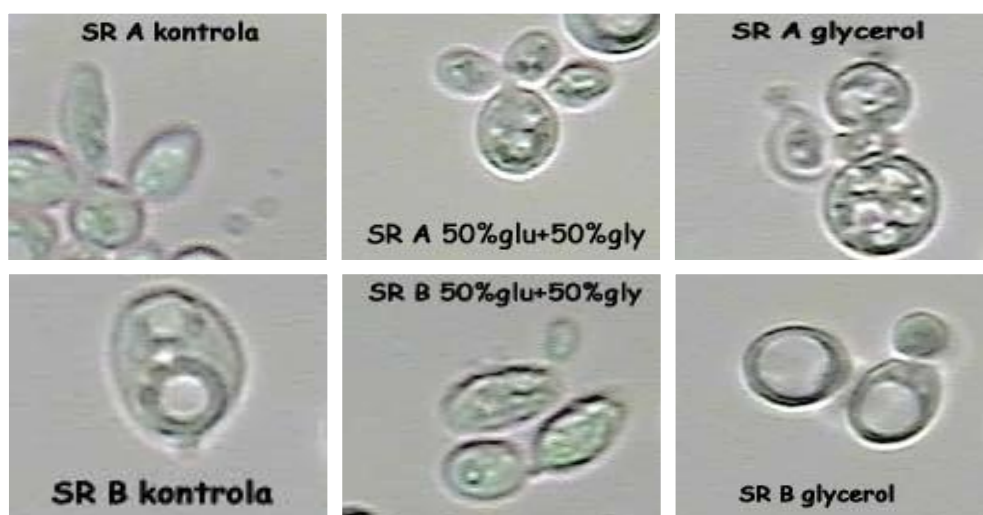
Obrázek 40: Obrázek buněk kmene *Rhodotorula aurantiaca* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (RA A/B kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.



Obrázek 41: Obrázek buněk kmene *Rhodotorula rubra* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (RR A/B kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.



Obrázek 42: Obrázek buněk kmene *Cystofilobasidium capitatum* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (CC A/B kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.

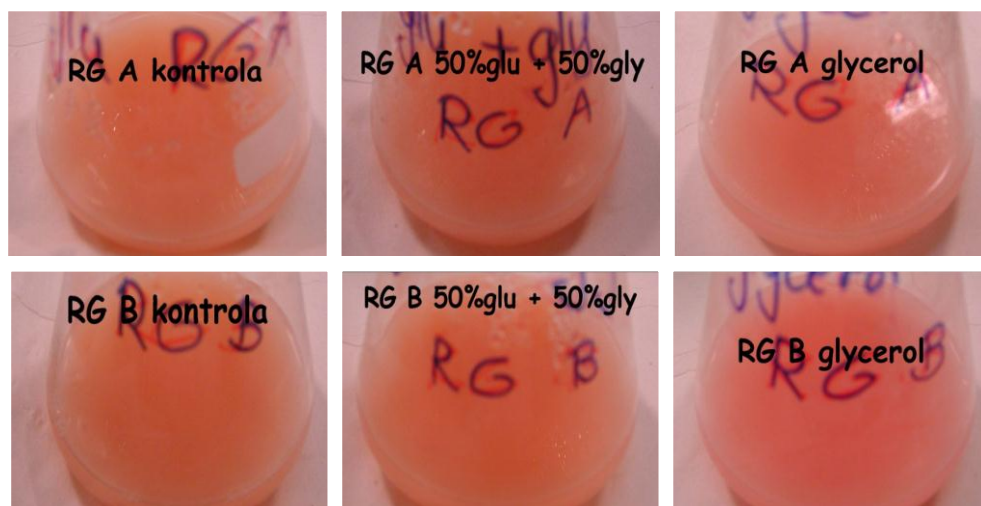


Obrázek 43: Obrázek buněk kmene *Sporobolomyces roseus* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (SR A/B kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.

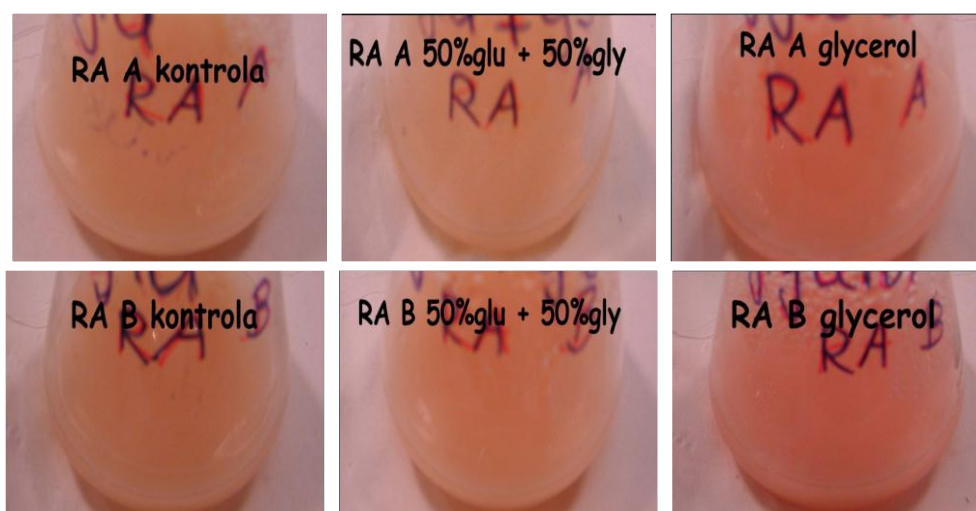


Obrázek 44: Obrázek buněk kmene *Sporobolomyces roseus* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (SSc A/B kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.

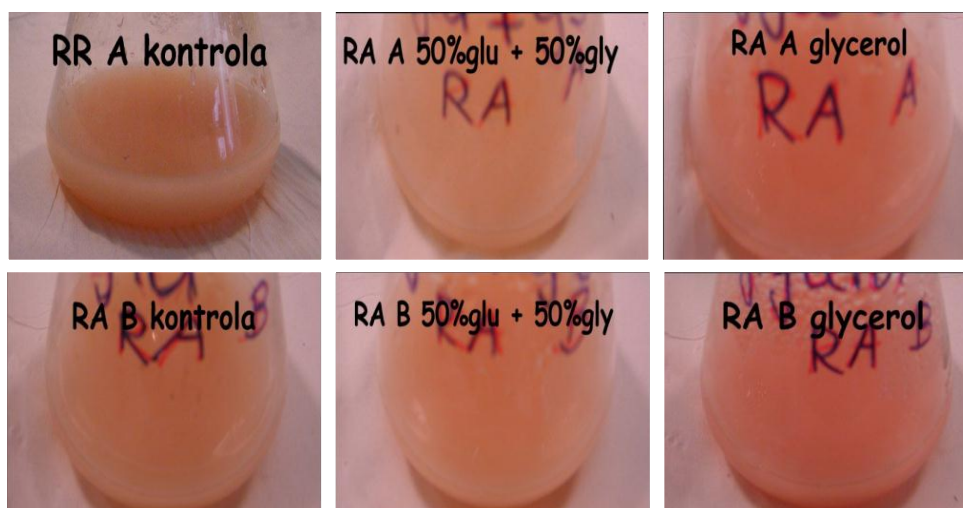
Reakce buněk kvasinek na glycerolové médium a médium obsahující glukosu a glycerol v poměru 1:1 nebyla nijak významné, pokud jde o změny morfologie buněk. Na obrázcích 39-44 je vidět, že většina kmenů v sérii A a B nabývala podobného tvaru jako kontrola A i B. Některé kmeny reagovaly na glycerolové médium v sérii A i B mírným zploštěním buněk a nabývaly oválného tvaru, což je patrné u kmenů *Rhodotorula aurantiaca* a *Rhodotorula rubra*. K zajímavým morfologickým změnám došlo zejména u kmene *Sporobolomyces roseus*. Buňky tohoto kmene reagovaly na médium obsahující glukosu a glycerol v poměru 1:1 kulovitějším tvarem vůči citronovitému tvaru kontroly a také viditelným hromaděním pigmentů na vnitřní straně cytoplasmatické membrány. Obdobným způsobem reagoval tento kmen i na čistě glycerolové médium. Viditelné pigmenty nacházející se na vnitřní straně cytoplasmatické membrány byly také v menší míře zaznamenány u kmene *Cystofilobasidium capitatum*.



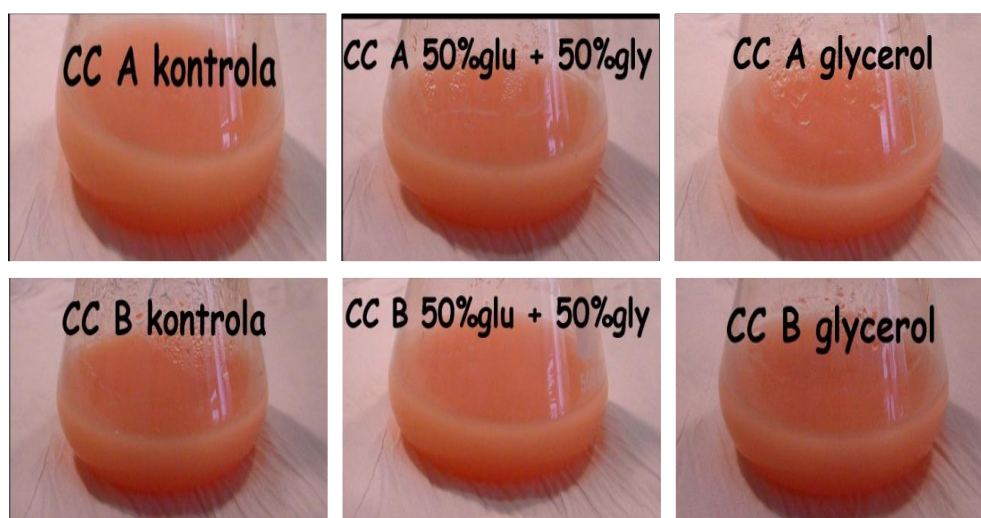
Obrázek 45: Změny zbarvení kmene *Rhodotorula glutinis* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (RG kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.



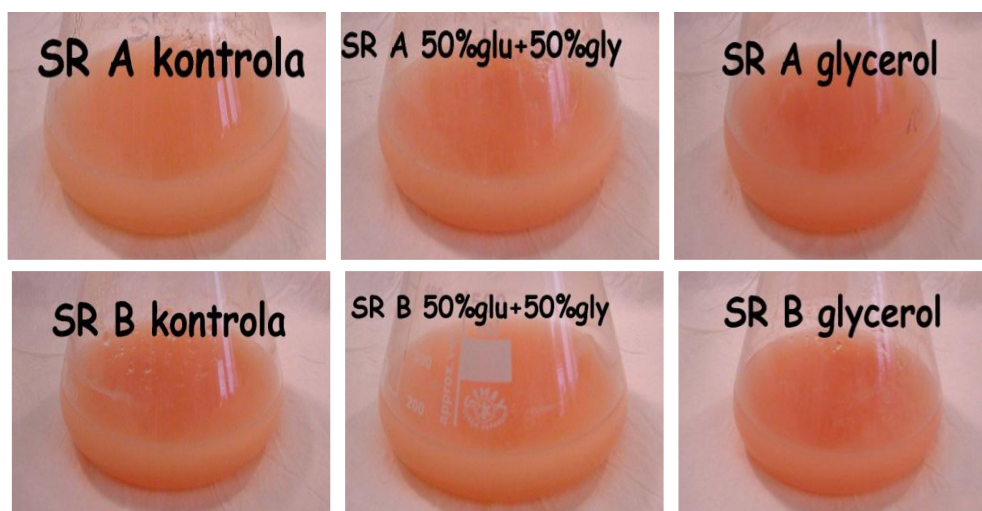
Obrázek 46: Změny zbarvení kmene *Rhodotorula aurantiaca* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (RA kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.



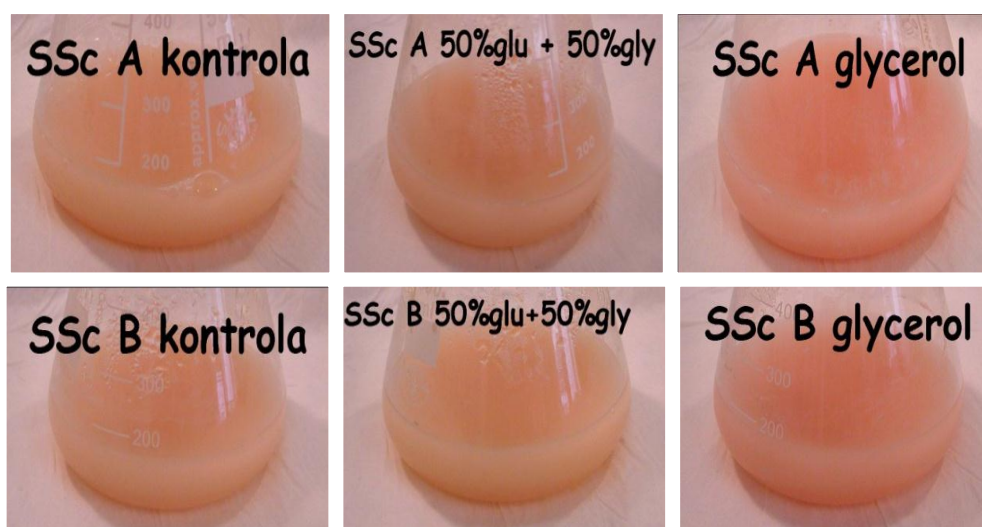
Obrázek 47: Změny zbarvení kmene *Rhodotorula rubra* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (RR kontrola) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.



Obrázek 48: Změny zbarvení kmene *Cystofilobasidium capitatum* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (CC kontrola A/B) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.



Obrázek 49: Změny zbarvení kmene *Sporobolomyces roseus* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (SR kontrola A/B) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.



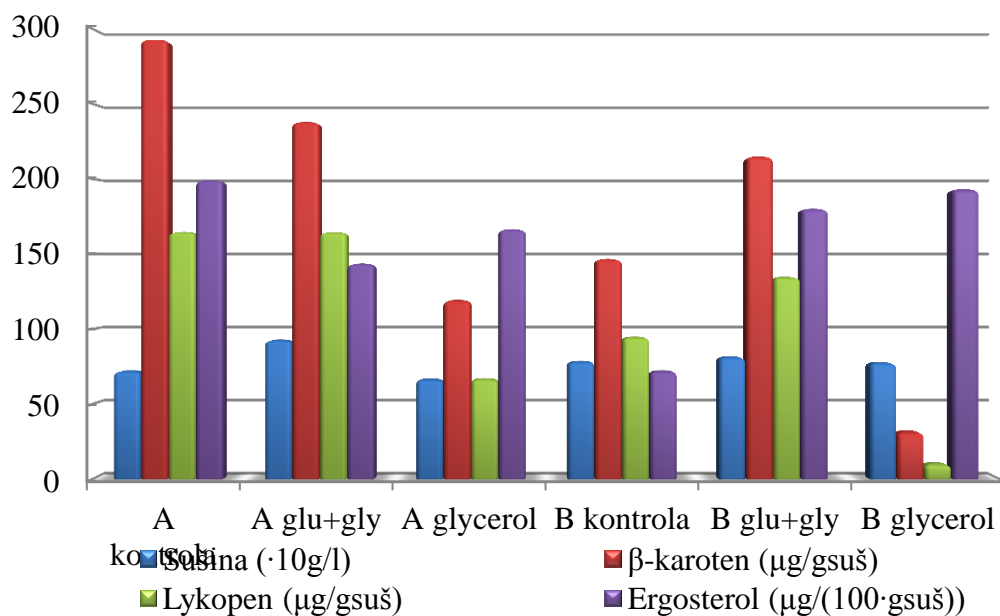
Obrázek 50: Změny zbarvení kmene *Sporobolomyces shibatanus* srovnání sérií A a B kultivovaného na glukose (SSc kontrola A/B) na směsi glukosy a glycerolu a glycerolu.

Jednotlivých kultury kvasinek v médiích s obsahem glukosy a glycerolu 1:1 měly téměř ve všech případech oranžové zbarvení podobné zbarvení kultur na kontrolních médiích sérií A i B. Kultury pěstované na glycerolu nabývaly ve většině případů růžově-oranžového zbarvení. Zbarvení kultivovaných kultur je zaznamenáno na obrázcích 41-46. Nejmarkantnější rozdíly ve zbarvení kultur kultivovaných na glycerolovém médiu je vidět na obrázcích 45 – 47 a 50.

5.1.2.2 Produkce karotenoidů kultivovanými kmeny v závislosti na složení média

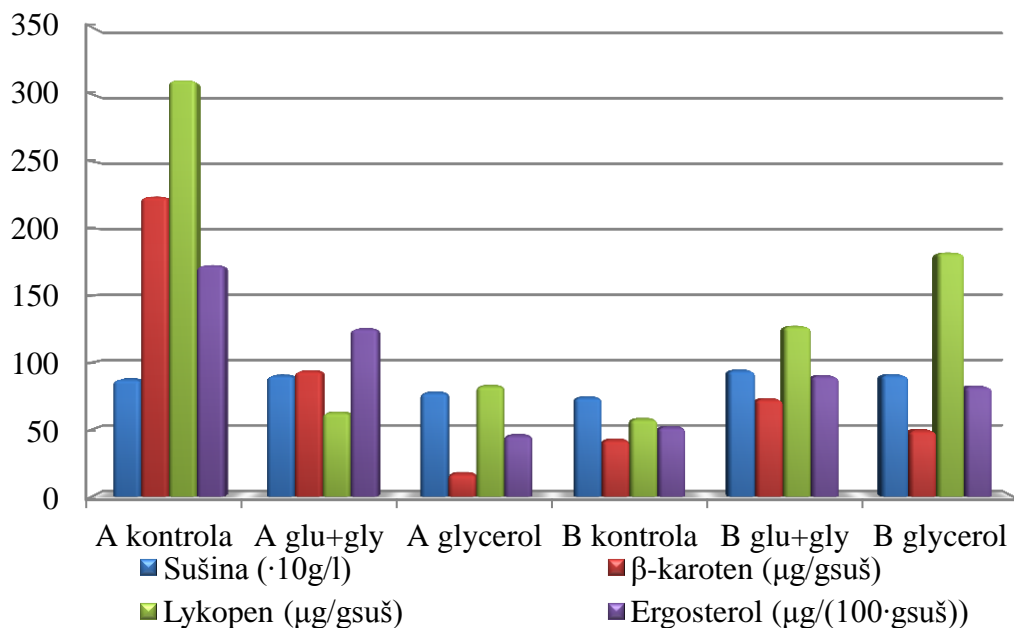
U každého kmene byla provedena identifikace a kvantifikace karotenoidů pomocí metody HPLC (kap. 4.3.11) jejíž vyhodnocení je patrné v grafech u každého kmene - viz následující. Přehled naměřených dat nárůstu biomasy, obsahu karotenoidů a ergosterolu je uveden v tabulce 13.

Rhodotorula glutinis



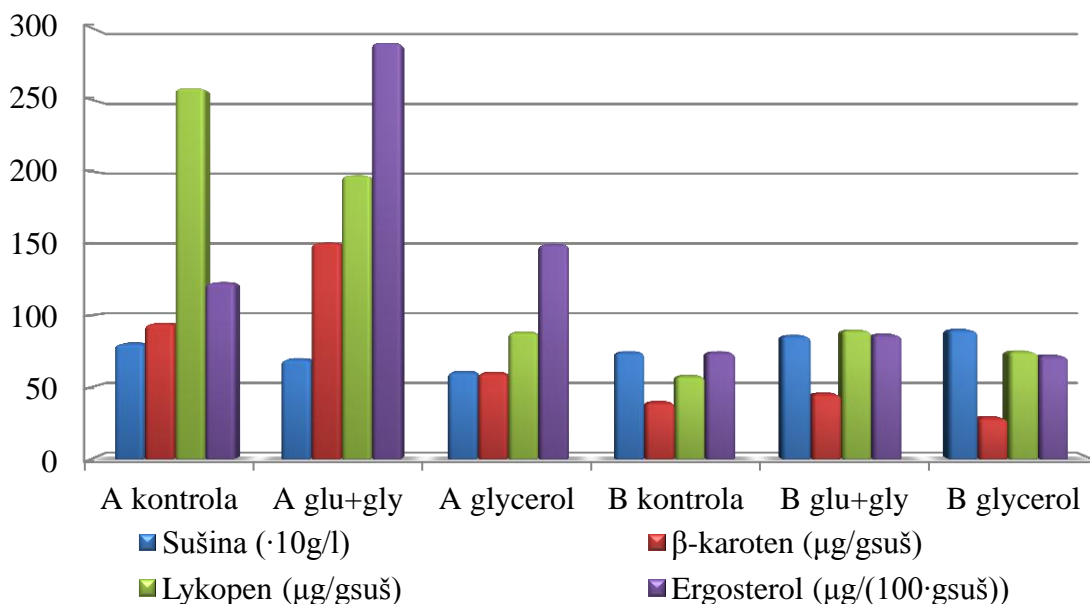
Obrázek 51: Graf znázorňující množství sušiny, karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Rhodotorula glutinis* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Rhodotorula aurantiaca



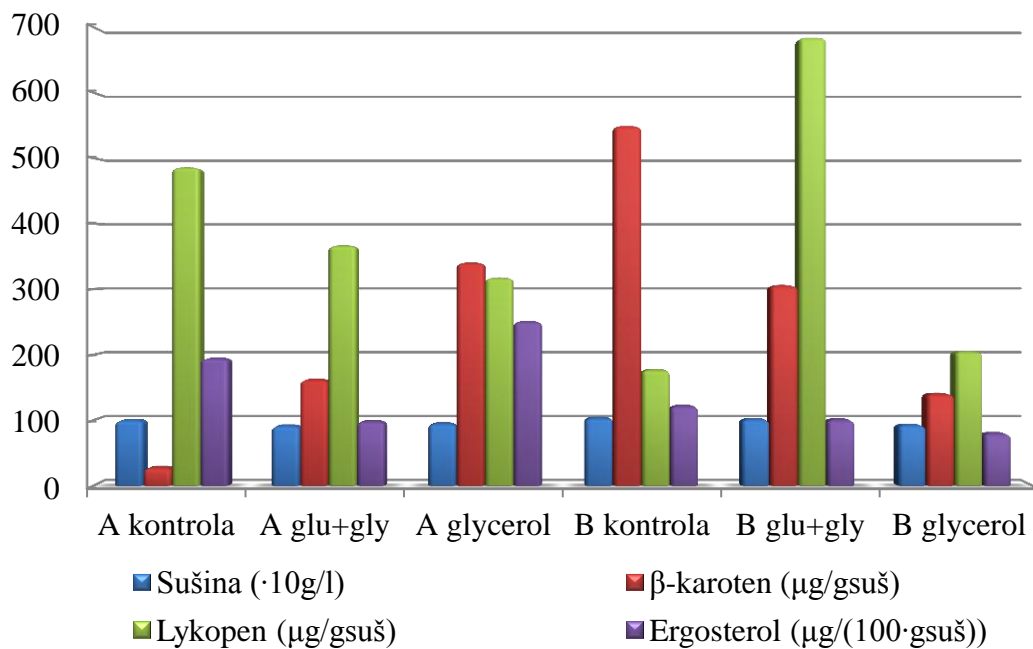
Obrázek 52: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Rhodotorula aurantiaca* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Rhodotorula rubra



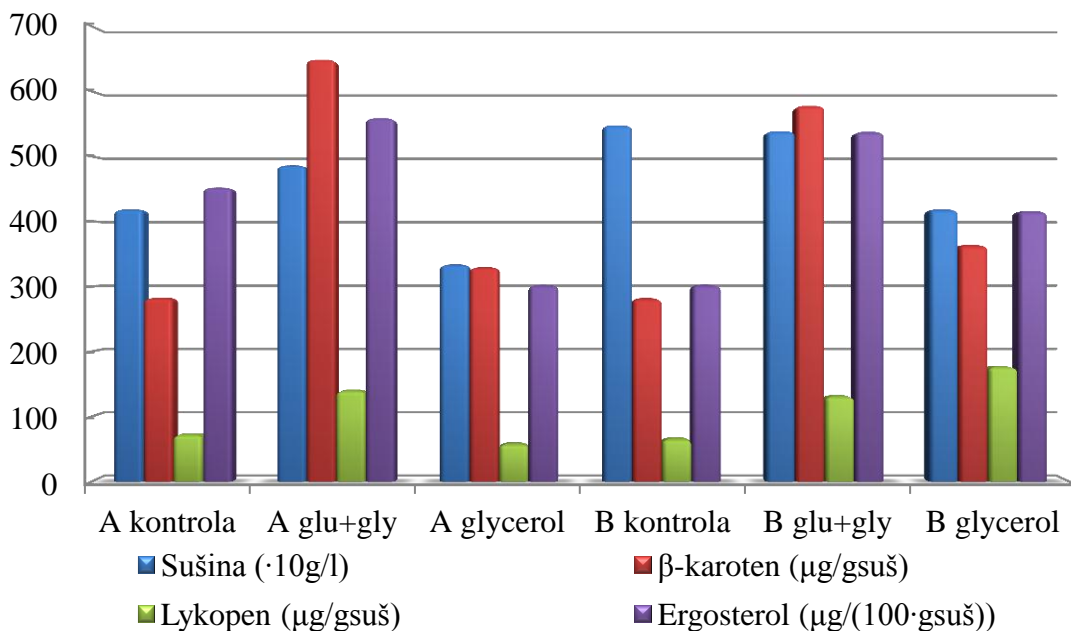
Obrázek 53: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Rhodotorula rubra* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Cystofilobasidium capitatum



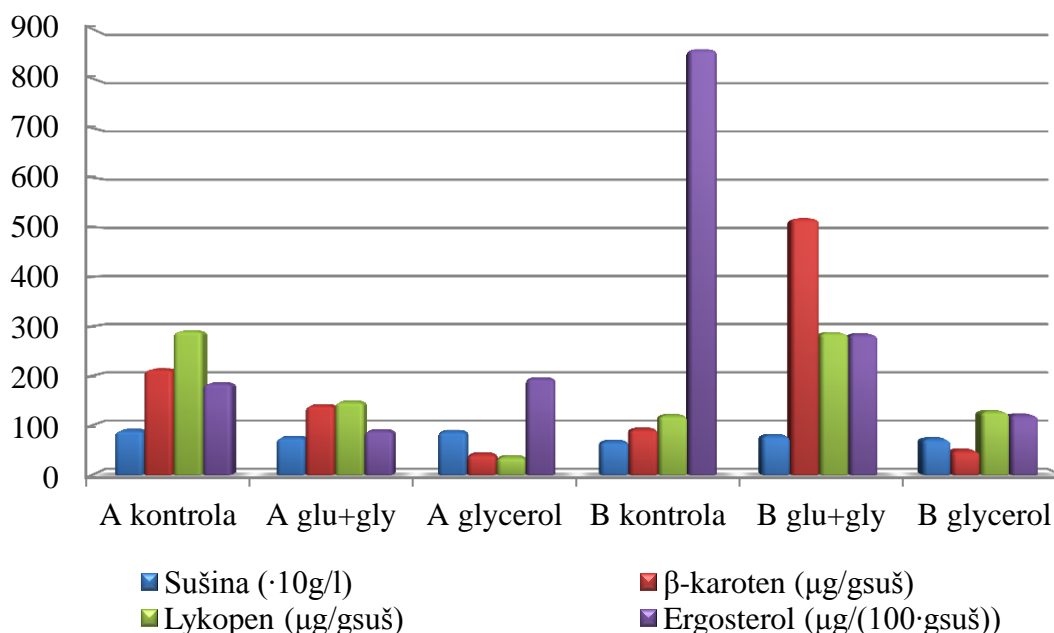
Obrázek 54: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Cystofilobasidium capitatum* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Sporobolomyces roseus



Obrázek 55: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Sporobolomyces roseus* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Sporobolomyces shibatanus



Obrázek 56: Graf znázorňující množství sušiny, kvantifikaci karotenoidů a ergosterolu v buňkách kmene *Sporobolomyces shibatanus* v jednotlivých sériích ve srovnání s kontrolou.

Žádný z kultivovaných kmenů nevykazoval výrazně zhoršený nárůst biomasy a dalo by se říct, že ve srovnání s kontrolami v sériích A i B byly naměřené hodnoty biomasy v médiích obsahujících glukosu i glycerol a v médiích obsahujících pouze glycerol téměř shodné u většiny kmenů, a v některých případech dokonce byla mírně zvýšená produkce biomasy. Zvýšené hodnoty nárůstu biomasy byly nejvíce viditelné u kmene *Rhodotorula aurantiaca* v sérii B na médiu se směsí glukosy a glycerolu, kde tyto hodnoty byly o 27 % vyšší než u kontroly. Další nadprodukce biomasy, ale již ne tak markantní, byly zaznamenány u kmenů *Rhodotorula rubra* v sériích A i B na médiu se směsí glukosy a glycerolu a *Rhodotorula glutinis* v sériích A i B na médiu se směsí glukosy a glycerolu.

U všech kultivovaných kmenů byly naměřeny vysoké hodnoty koncentrace ergosterolu, z nichž nejvyšší produkci ergosterolu měl kmen *Sporobolomyces roseus* v obou sériích a na médiu s obsahem glukosy i glycerolu. Tento kmen vykazoval zvýšenou produkci ergosterolu vůči kontrole A o 23 % a v sérii B dokonce o 78 % vůči kontrolám. Vyšší produkci ergosterolu měly také kmeny *Rhodotorula glutinis* v sérii B na obou typech médií, *Rhodotorula rubra* v sérii A na médiu s glukosou a glycerolu. Pozoruhodný obsah lykopenu i β-karotenu obsahoval kmen *Sporobolomces roseus*. Ve srovnání s kontrolami v sériích A i B byl obsah lykopenu kultury z glycerolového média o 34 % vyšší než u kontroly B. Obsah β-karotenu v buňkách toho kmene byl u série A i B na směsném médiu glukosy a glycerolu až dvojnásobný ve srovnání s kontrolou.

Obecně lze kultivaci na glycerolu využít k produkci ergosterolu i karotenoidů použitými kmeny kvasinek. Nejvhodnějším médiem byla směs glukosy a glycerolu. Na této směsi byly hodnoty měřených metabolitů vyšší než na samotném glycerolovém

médiu a v určitých případech byly hodnoty metabolitů na směsném médiu vyšší vůči kontrolám. Z použitých kmenů je na základě získaných hodnot nejvhodnější pro kultivaci na glycerolu kmen *Sporobolomyces roseus* jehož produkce ergosterolu, lykopenu i β -karotenu byla nejvyšší.

Z výsledků kultivace karotenogenních kvasinek na glycerolu je patrné, že všechny studované kmeny jsou schopny využít jej jako zdroj uhlíku a energie pro růst a produkci pigmentů. Sestava produkovaných pigmentů na glycerolovém médiu se nijak významně nelišila od sestavy pigmentů produkovaných na kontrolním glukózovém médiu. Přestože nejlepší výsledky byly dosaženy na směsném médiu obsahujícím glukózu i glycerol, pro případnou utilizaci odpadního glycerolu z produkce biopaliv je důležité zjištění, že kvasinky jsou schopny jej využívat, i když s poněkud nižším výtěžkem. Zhodnocení odpadní suroviny za účelem produkce průmyslově významných metabolitů je jistě perspektivní a efektivní strategií. Z hlediska celkových produkčních vlastností i stability se jako velmi zajímavý z hlediska potenciálního uplatnění jeví druh *Cystofilobasidium capitatum*, případně některé druhy rodu *Rhodotorula*.

Tabulka 12: Tabulka naměřených hodnot koncentrace sušiny, lykopenu, β -karotenu, ergosterolu a naměřené hodnoty aktivity lipázy

Kultivace na oleji						
kmen	série A/B	Množství sušiny (g·dm ⁻³)	Aktivita lipázy ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{min}^{-1}$)	Lykopen ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny)	Ergosterol ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny)	β -karoten ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny)
RG	kontrola	4,090		330,057	2887,247	432,073
	A olej	4,050	1,93E-03	40,419	1721,911	10,234
	B olej	4,404	neprůkazné	0,000	780,478	0,000
RA	kontrola	8,424		46,768	504,176	56,083
	A olej	9,469	1,00E-02	0,000	456,364	4,872
	B olej	5,727	6,38E-04	89,772	1309,359	6,138
RR	kontrola	8,210		50,742	750,721	151,663
	A olej	4,943	3,55E-03	0,000	810,129	20,176
	B olej	2,349	1,64E-05	0,000	1866,874	57,755
CC	kontrola	7,811		123,117	623,547	62,923
	A olej	6,996	5,89E-04	210,835	568,714	0,000
	B olej	6,205	3,92E-04	79,973	1241,323	6,168
SR	kontrola	5,935		211,700	1569,185	1660,727
	A olej	2,713	neprůkazné	79,584	3961,661	728,187
	B olej	2,159	neprůkazné	144,827	2799,863	276,247
SSc	kontrola	8,698		18,553	562,961	33,385
	A olej	3,060	1,64E-05	0,000	1025,277	11,533
	B olej	2,405	neprůkazné	0,000	2106,560	0,000

Tabulka 13: Tabulka naměřených hodnot koncentrace sušiny, lykopenu, β -karotenu a ergosterolu

Kultivace na glycerolu									
kmen	série A/B	Množství sušiny (g·dm ⁻³)		Lykopen ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny)		Ergosterol ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny)		β -karoten ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny)	
		A	B	A	B	A	B	A	B
RG	kontrola	7,190	7,829	164,766	94,513	1993,974	718,800	293,323	146,733
	glu + gly	9,257	8,133	164,639	134,705	1435,880	1803,295	238,350	215,237
	glycerol	6,643	7,758	66,648	9,963	1666,456	1934,018	119,158	31,345
RA	kontrola	8,766	7,408	311,077	57,874	1726,963	519,345	224,085	42,316
	glu + gly	9,049	9,430	62,818	127,257	1254,556	901,578	93,850	72,818
	glycerol	7,769	9,088	82,667	182,192	456,816	823,291	17,185	49,519
RR	kontrola	8,052	7,432	258,820	57,684	1230,005	742,826	94,484	39,250
	glu + gly	6,952	8,585	197,817	89,694	2904,965	866,953	150,696	45,294
	glycerol	6,061	9,004	88,353	74,942	1498,992	720,233	59,890	28,647
CC	kontrola	10,028	10,339	486,792	177,260	1945,955	1217,018	2,775	55,014
	glu + gly	9,165	10,147	367,402	685,462	982,534	1009,867	16,202	30,643
	glycerol	9,488	9,285	317,941	205,214	2509,422	799,691	34,096	14,043
SR	kontrola	4,192	5,489	723,152	654,840	4525,956	3024,186	2826,386	2817,839
	glu + gly	4,869	5,398	1398,453	1311,607	5596,780	5388,722	6498,329	5788,448
	glycerol	3,341	4,192	578,703	1766,923	3022,437	4165,438	3298,056	3640,395
SSc	kontrola	9,000	6,714	290,772	119,801	1848,788	8612,812	213,368	92,177
	glu + gly	7,564	7,916	147,615	287,114	890,757	2846,876	140,426	518,701
	glycerol	8,766	7,252	36,240	128,070	1951,934	1212,521	41,726	49,201

6 ZÁVĚR

Cílem práce byla optimalizace metod kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních lipidických substrátech a glycerolu. Kultivace byla prováděna v kontrolních médiích s glukózou, v médiích obsahující směs těchto substrátů a glukosy 1:1 a v médiích obsahujících jako jediný zdroj uhlíku buď řepkový olej nebo glycerol. V případě řepkového oleje byly použity dvě série médií (série A, B) lišící se ve složení inokula II (série A – glukosa, série B- glukosa a řepkový olej 1:1). V případě glycerolu byly také použity dvě série médií A a B s odlišným složením inokula II (A – glukózy, B- směs glukózy a glycerolu 1:1). Jako produkční média byly v případě glycerolu použity média obsahující samotnou glukózu, směs glukózy a glycerolu a média obsahující pouze glycerol jako zdroj uhlíku. Tato média byla použita v obou sériích - A i B.

V průběhu kultivace na oleji byla z hlediska produkce karotenoidů u většiny kmenů výhodnější série A, kde nebyly kmeny vystaveny působení oleje již od inokula II. Je možné, že příznivý vliv by mohl mít přidavek detergentů do kultivačních médií, což bude předmětem navazujících experimentů. Nejlepším producentem karotenoidů a ergosterolu na oleji byl kmen *Sporobolomyces roseus*, avšak ve srovnání s kontrolou nebyl obsah karotenoidů výrazně zvýšený. U většiny ostatních kmenů došlo k významně snížené produkci lykopenu a β -karotenu ve srovnání s kontrolou. Při kultivaci na olejovém médiu došlo rovněž k významné změně sestavy produkovaných pigmentů – kromě charakteristických zástupců (lykopen, beta-karoten, torulen) byl zaznamenán vznik atypických oxidovaných pigmentů neznámé struktury, které byly eluovány v průběhu prvních 2-3 minut a které zřejmě ovlivňovaly výsledné neobvyklé zbarvení kultur. Identifikace by vyžadovala detailní analýzu pomocí LC/MS technik. Dále byla stanovena aktivita lipázy u jednotlivých kmenů. Aktivita lipázy byla u většiny kmenů poměrně nízká a její produkce poměrně dobře odpovídá schopnosti jednotlivých kmenů růst a produkovat pigmenty na olejovém médiu. Za použitých kultivačních podmínek ve výše popsaných screeningových experimentech byly jako kmeny potenciálně použitelné ke kultivaci na lipidech označeny *Cystofilobasidium capitatum* a v menší míře všechny kmeny rodu *Rhodotorula*. Kultivační podmínky by se však musely dále optimalizovat.

V kultivaci na glycerolu je těžké jednoznačně určit sérii, ve které kmeny produkovaly více karotenoidů, protože výsledky jsou specifické pro každý kmen. Obecně ale lze říci, že médium, na kterém kmeny produkovaly ve většině případů více karotenoidů obsahovalo směs glukosy a glycerolu 1:1. Nejvíce karotenoidů i ergosterolu produkoval opět kmen *Sporobolomyces roseus*, u něhož byla zaznamenána až 2,5-násobná produkce pigmentů i ergosterolu. Z výsledků kultivace karotenogenních kvasinek na glycerolu je patrné, že všechny studované kmeny jsou schopny využít jej jako zdroj uhlíku a energie pro růst a produkci pigmentů. Sestava produkovaných pigmentů na glycerolovém médiu se nelišila od tradiční sestavy pigmentů produkovaných na kontrolním glukózovém médiu. Přestože nejlepší výsledky byly dosaženy na směsném médiu obsahujícím glukózu i glycerol, pro případnou utilizaci odpadního glycerolu z produkce biopaliv je důležité zjištění, že kvasinky jsou schopny využívat i samotný glycerol, i když s poněkud nižším výtěžkem. Z hlediska celkových produkčních vlastností i stability se jako velmi zajímavý z hlediska potenciálního průmyslového uplatnění jeví druh *Cystofilobasidium capitatum*, případně některé druhy rodu *Rhodotorula*.

LITERATURA

- [1] GRUSZECKI, Wiesław I. ; STRZAŁKA, Kazimierz . Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 30 May 2005, 1740, 2, [cit. 2011-04-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T1Y-4F1T50B-2/2/0059d0c8fe5b5c5d6911d51d6cb5cc46>>. ISSN 0925-4439.
- [2] STEINBÜCHEL, A; KOYAMA, T. Biopolymers : Polyisoprenoids. Vyd.2. *Weinheim* : Wiley-VCH, 2001. 425 s. ISBN 3-527-30221-2.
- [3] VELÍŠEK, Jan; HAJŠLOVÁ, Jana. Chemie potravin II. 3. rozšířené a přepracované vydání. Tábor : OSSIS, 2009. 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [4] SOLOMONS, T.W. Graham; FRYHLE, Craig B. Organic chemistry. 8. vydání. Hoboken ,NJ : John Willie &sons, 2004. 1255 s. ISBN 0-471-41799-8.
- [5] BRITTON, George. Structure and properties of carotenoids in relation to function. The FASEB journal [online]. 1995 , 9, [cit. 2011-04-14]. Dostupný z WWW: <<http://www.fasebj.org/content/9/15/1551.short>>.
- [6] FRASER, Paul D; BRAMLEY, Peter M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Progress in Lipid Research [online]. May 2004, 43, 3, [cit. 2011-04-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TBP-4B3MR39-2/2/8290f78a0e2b1b66dd07539a4a22ae97>>. ISSN 0163-7827.
- [7] ŠILHÁNOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. rozšířené vydání. Praha : ACADEMIA, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [8] WALKER, Graeme M. Yeast Physiology and Biotechnology . Chichester : John Wiley and Sons Ltd., 1998. 350 s. ISBN 0-471-96446-8.
- [9] KURTZMAN, Cletus P. ; FELL, Jack W. The Yeasts, A Taxonomie Study. 4. vydání. Amsterdam : ELSEVIER, 1998. 1074 s. ISBN 0-444-81312-8.
- [10] YURKOV, A. M. , et al. Pigmented Basidiomycetous Yeasts Are a Promising Source of Carotenoids and Ubiquinone Q 10. Microbiology, [online]. 2008, 77, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/t20788r18g442523/fulltext.pdf>>. ISSN 0026-2617.
- [11] BAEZA, Marcelo, et al. The Inter-generic Fungicidal Activity of Xanthophyllomyces dendrorhous. The Journal of Microbiology [online]. 2010, 48, 6, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://springerlink.metapress.com/content/88530w53p2p78711/fulltext.pdf>>.
- [12] American society for microbiology Washington DC [online]. 2005 [cit. 2011-04-19]. Microbe library. Dostupné z WWW: <3Divns&ei=00etTd2YI4i0tAar-ITXDA>.
- [13] AGEITOS, Jose Manuel , et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. Appl Microbiol Biotechnol [online]. February 2011, 10, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/68q867g5w4152435/fulltext.pdf>>.
- [14] YANG, Shi-Ping , et al. Distribution of Marine Red Yeasts in Shrimps and the Environments of Shrimp Culture. Curr Microbiol [online]. 2011, 10, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/mr2x2024w21u6024/fulltext.pdf>>.
- [15] Medical Mycology Research Center [online]. 2010 [cit. 2011-04-19]. Rhodotorula mucilaginosa colony. Dostupné z WWW: <http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/r/Rhodotorula_mucilaginosa_colony.htm>.

- [16] HÁRONIKOVÁ, A. Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 92 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [17] MONTANTI, Justin; NGHIEM, Nhuan P.; JOHNSTON, David B. . Production of Astaxanthin from Cellulosic Biomass Sugars by Mutants of the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl Biochem Biotechnol* [online]. 2011, 1, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/k4735w2433663951/fulltext.pdf>>.
- [18] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [19] VELÍŠEK, Jan; HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin I. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* . Tábor : OSSIS, 2009. 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [20] VELÍŠEK, Jan; CEJPEK, Karel. *Biosynthesis of food components*. 1.vydání. Tábor : OSSIS, 2008. 512 s. ISBN 978-8086659-12-1.
- [21] CASPI, Ron, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Oxford Journals* [online]. 22 October 2009, 38, [cit. 2011-04-18]. Dostupný z WWW: <http://nar.oxfordjournals.org/content/38/suppl_1/D473.full.pdf+html>.
- [22] MÁROVÁ, Ivana, et al. Biotechnological production of carotenoids by transgenic bacteria and red yeast. *Chemické listy* [online]. 2005, 99, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_14_s267-s364.pdf>.
- [23] SAENGE, Chanika, et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* [online]. January 2011, 1, 46, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB50W1THY-2/2/c2668f1fd86d8b06d4b706b5a62ceebe>>. ISSN 1359-5113.
- [24] AKSU, Zumriye; EREN, Ayse Tugba. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 15 July 2007, 35, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V5N-4MV759C-2/2/08aeb6110a578a0de7196868e0a6aff6>>. ISSN 1369-703X.
- [25] SAENGE, Chanika; CHEIRSILP, Benjamas. Efficient Concomitant Production of Lipids and Carotenoids by Oleaginous Red Yeast *Rhodotorula glutinis* Cultured in Palm Oil Mill Effluent and Application of Lipids for Biodiesel Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [online]. 2011, 16, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/v642715656747105/fulltext.pdf>>. ISSN 12257-010-0083-2.
- [26] Dvořáková T.: Sledování metabolických změn karotenogenních kvasinek v závislosti na podmínkách kultivace. Diplomová práce, FCH VUT v Brně, 2008.
- [27] Hezinová V.: Diplomová práce, VUT Brno, 2007
- [28] WROLSTAD, Ronald E., et al. *Handbook of food analytical chemistry : Water, Proteins, Enzymes, Lipids and Carbohydrates*. 2.vyd. Hoboken, New Jersey USA : John Wiley & Sons, 2005. 757 s.

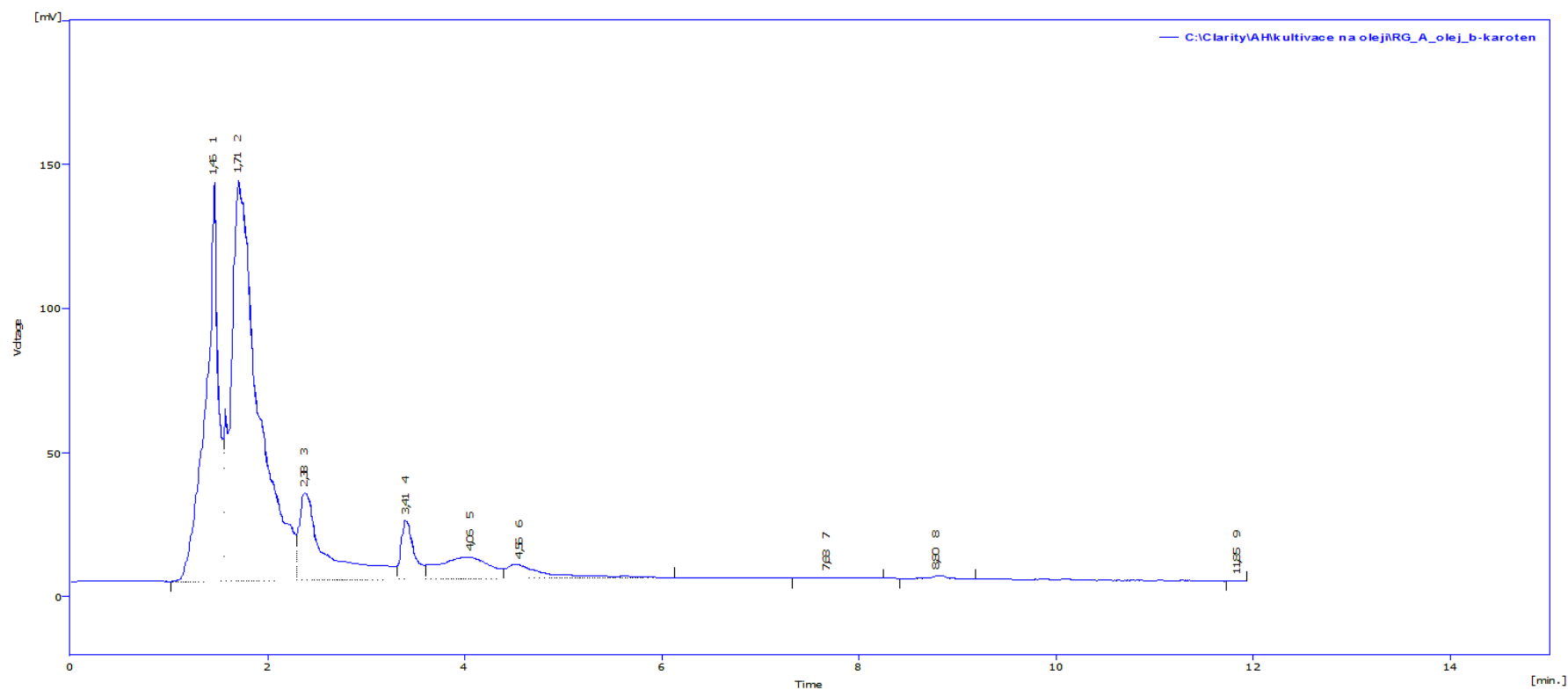
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

UV	Ultrafialové světlo
HPLC	Vyskoúčinná kapalinová chromatografie
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
RA	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
RR	<i>Rhodotorula rubra</i>
CC	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>
SR	<i>Sporobolomyces roseus</i>
SSc	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>
glu+gly	médium obsahující glukosu i glycerol 1:1
gly	médium obsahující glycerol
kontrola	kontrolní médium obsahující glukosu

SEZNAM PŘÍLOH

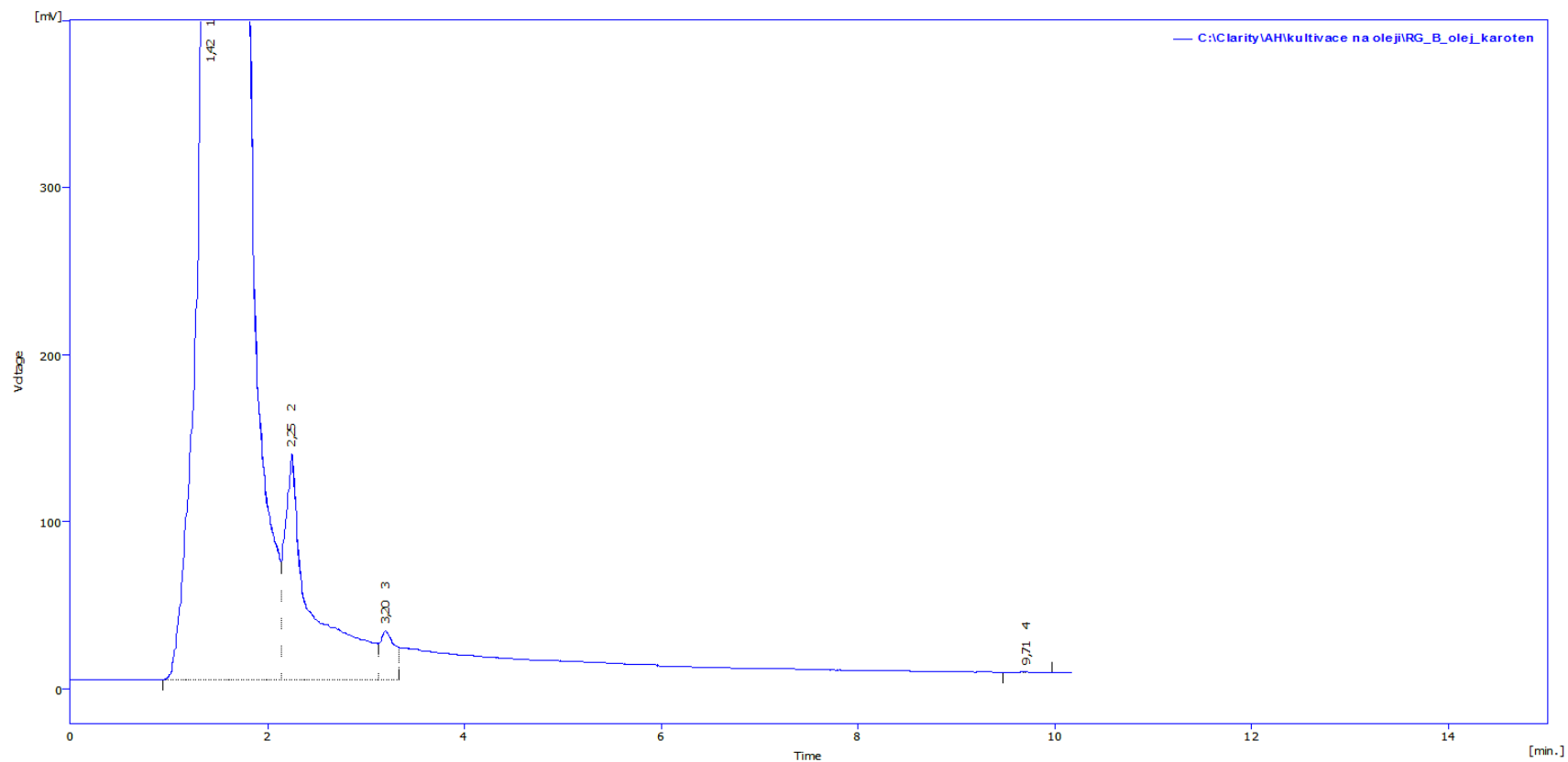
- A Chromatogram RG - OLEJ Série A
- B Chromatogram RG - OLEJ Série B
- C Chromatogram RR – OLEJ KONTROLA
- D Chromatogram RR – OLEJ Série B
- E Chromatogram RA – OLEJ KONTROLA
- F Chromatogram RA – OLEJ A
- G Chromatogram CC – OLEJ B
- H Chromatogram SR – OLEJ A
- I Chromatogram SR – OLEJ B
- J Chromatogram SR – GLYCEROL A
- K Chromatogram SSC – KONTROLA
- L Chromatogram SSC – OLEJ A
- M Chromatogram SSC – OLEJ B
- N Chromatogram SR – GLYCEROL KONTROLA A
- O Chromatogram SR – GLUKOSA-GLYCEROL 1:1

A CHROMATOGRAM RG - OLEJ SÉRIE A



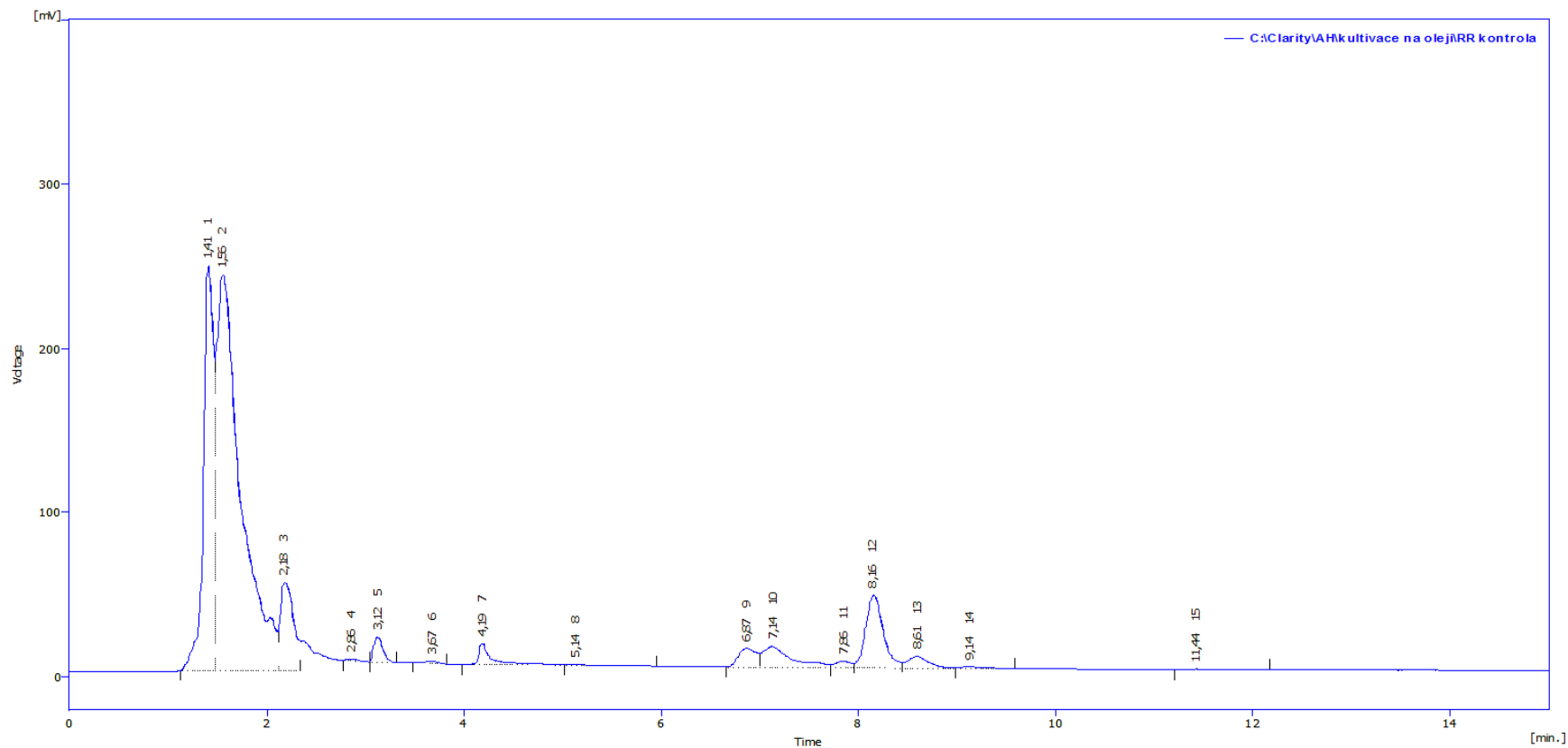
Obrázek P1: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Rhodotorula glutinis* na olejovém médiu série A HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ pro zjištění obsahu β -karotenu.

B CHROMATOGRAM RG - OLEJ SÉRIE B



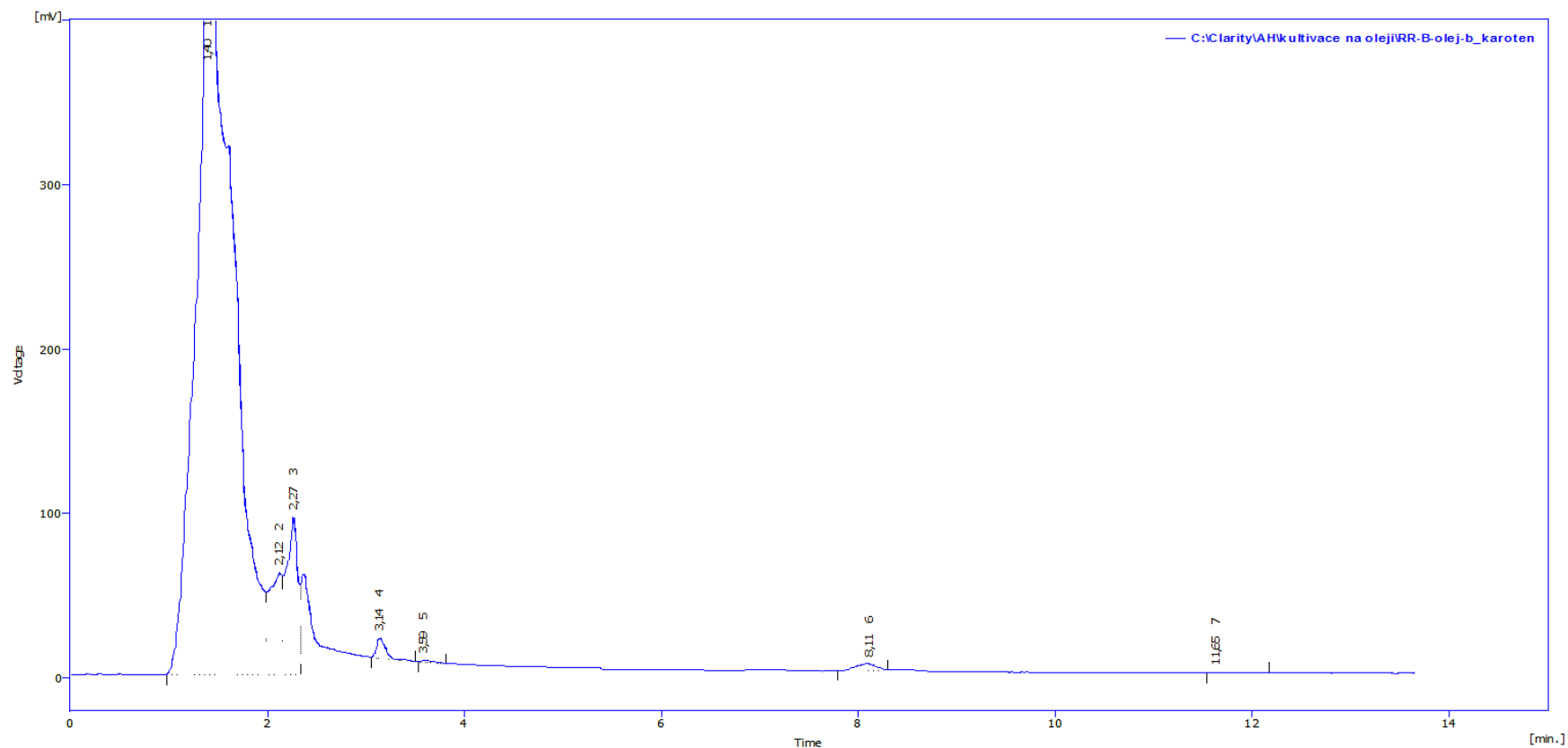
Obrázek P2: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Rhodotorula glutinis* na olejovém médiu série B HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ pro zjištění obsahu β -karotenu.

C CHROMATOGRAM RR – OLEJ KONTROLA



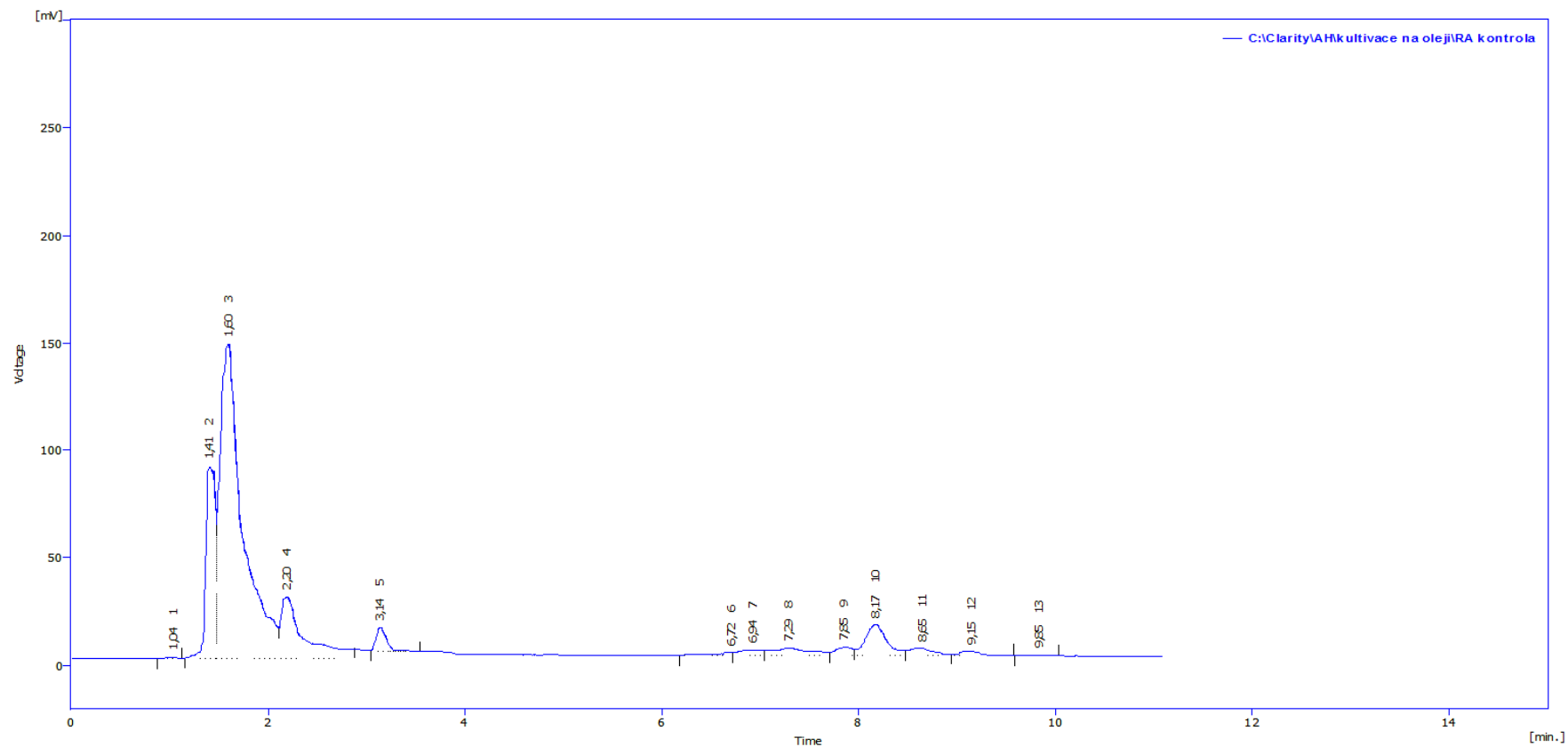
Obrázek P3: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Rhodotorula rubra* na glukosovém médiu metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

D CHROMATOGRAM RR – OLEJ SÉRIE B



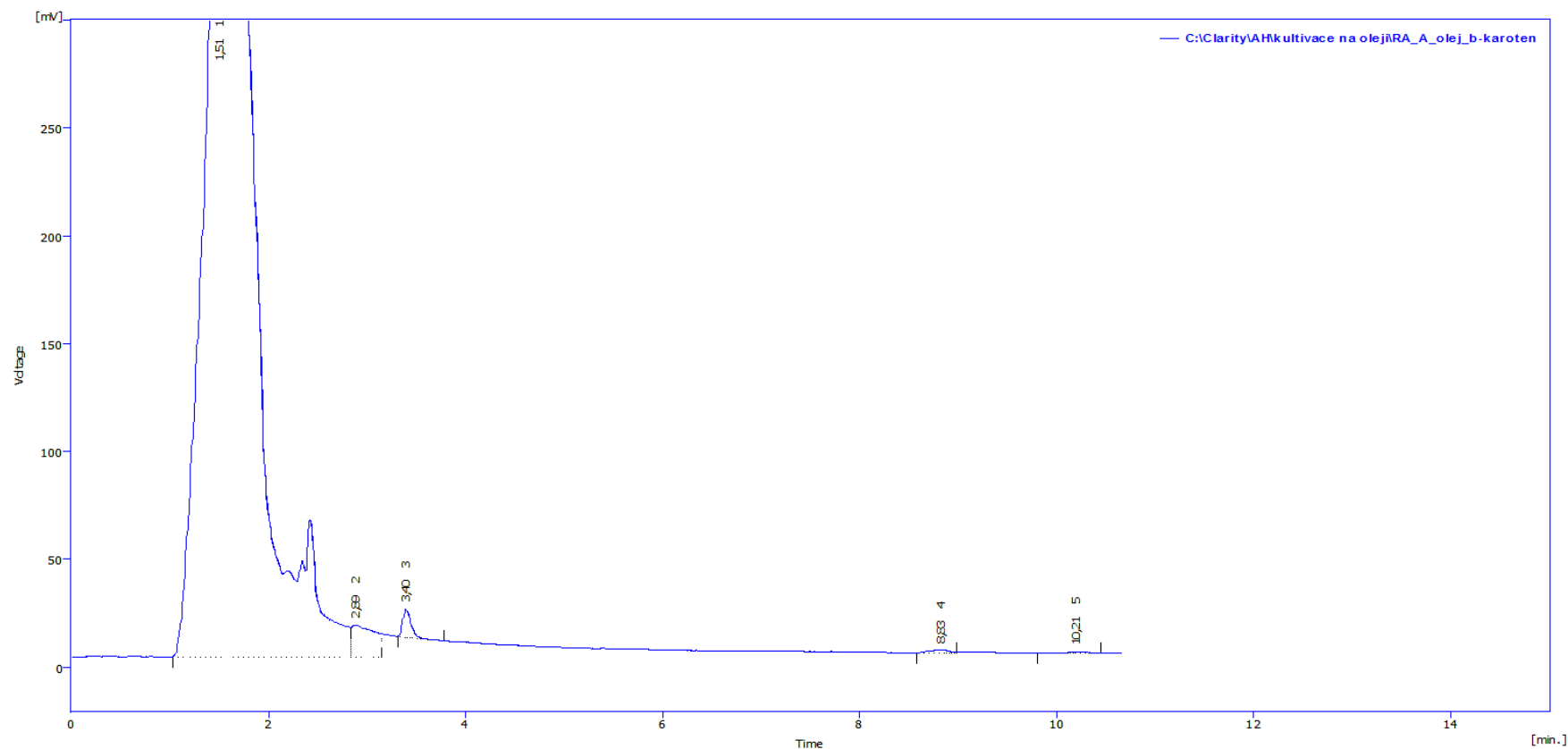
Obrázek P 4: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Rhodotorula rubra* na olejovém médiu série B metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

E CHROMATOGRAM RA – OLEJ KONTROLA



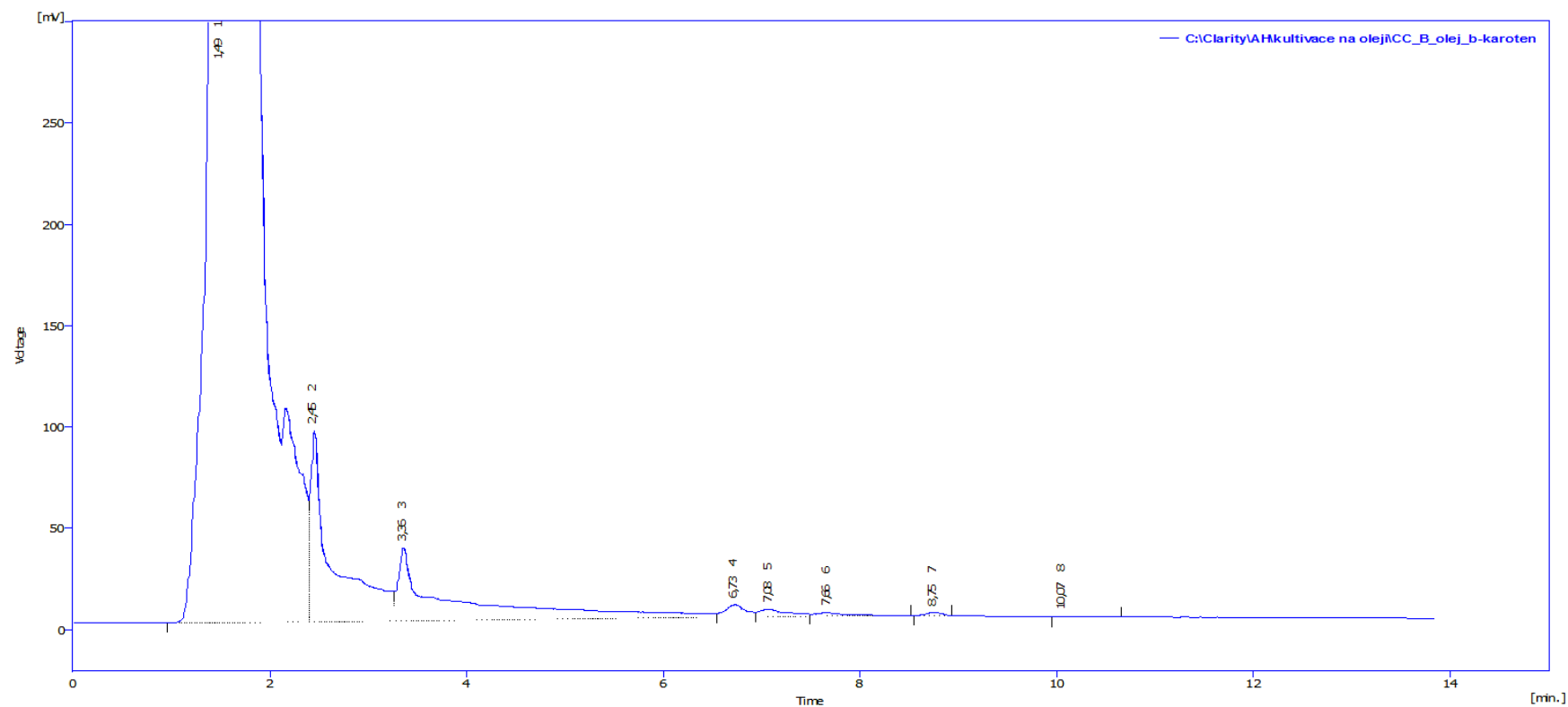
Obrázek P 5: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* na glukózovém médiu metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

F CHROMATOGRAM RA – OLEJ SÉRIE A



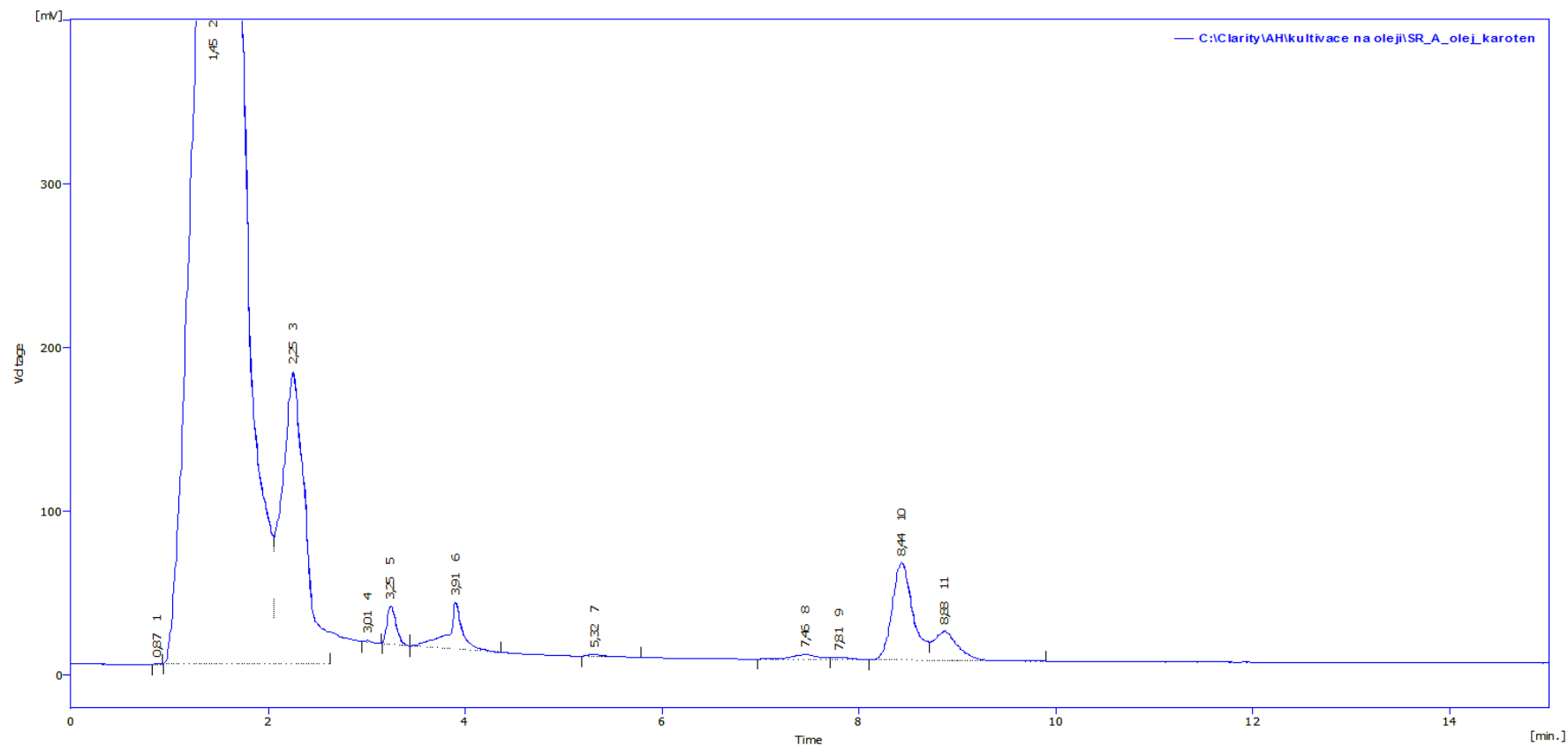
Obrázek P6: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* na olejovém médiu série A metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

G CHROMATOGRAM CC – OLEJ SÉRIE B



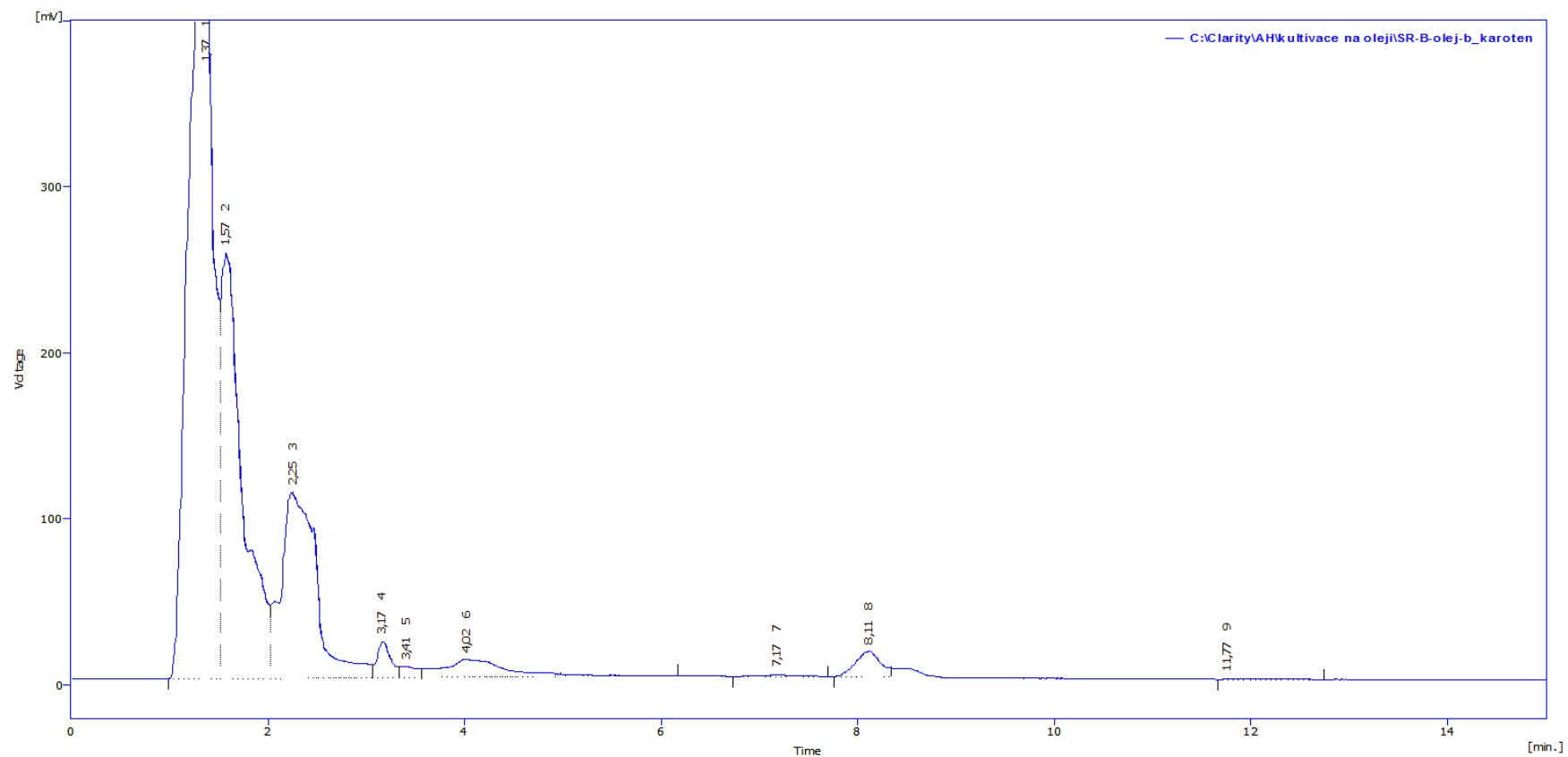
Obrázek P7: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* na olejovém médiu série B metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

H CHROMATOGRAM SR – OLEJ SÉRIE A



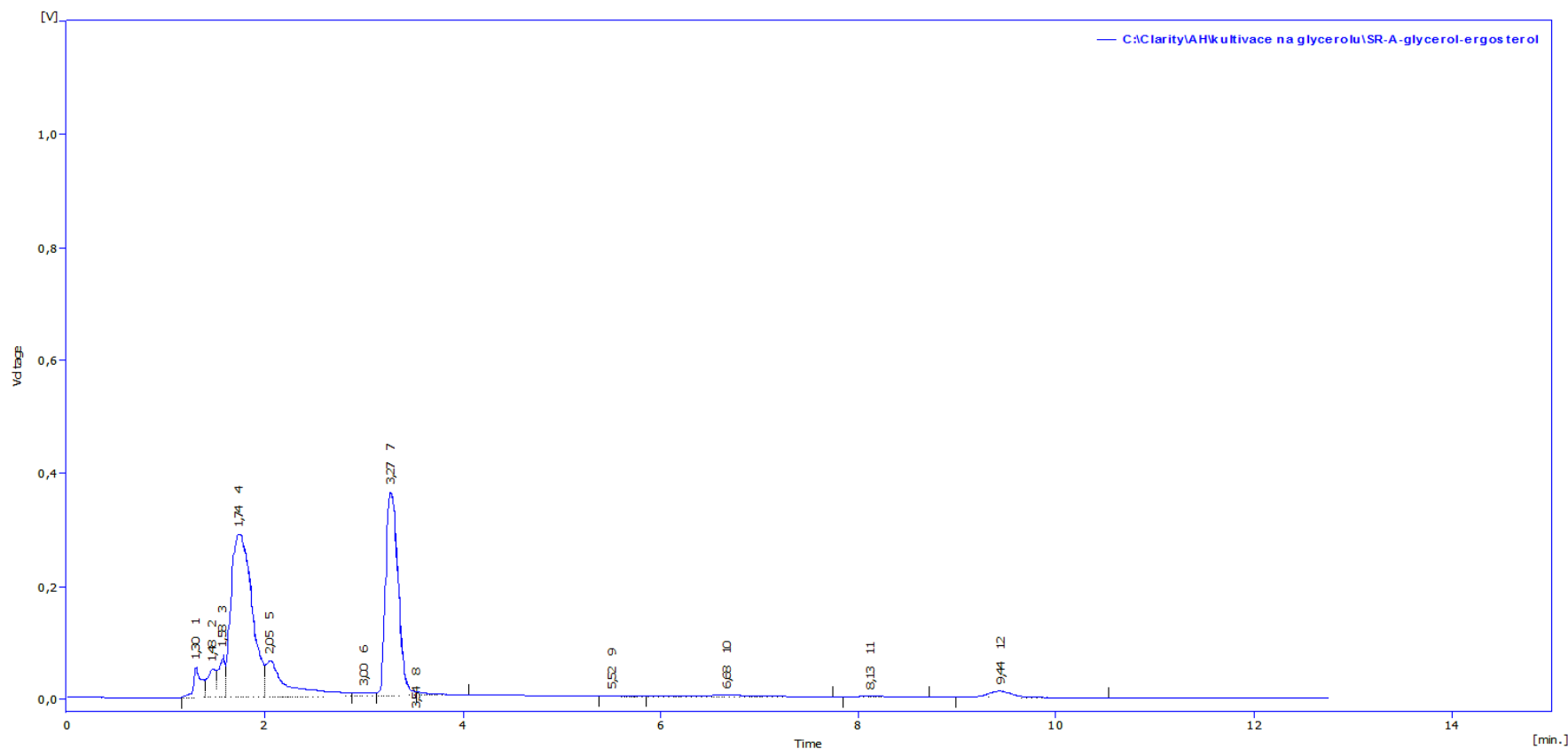
Obrázek P8: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Sporobolomyces roseus* na olejovém médiu série A metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

I CHROMATOGRAM SR – OLEJ SÉRIE B



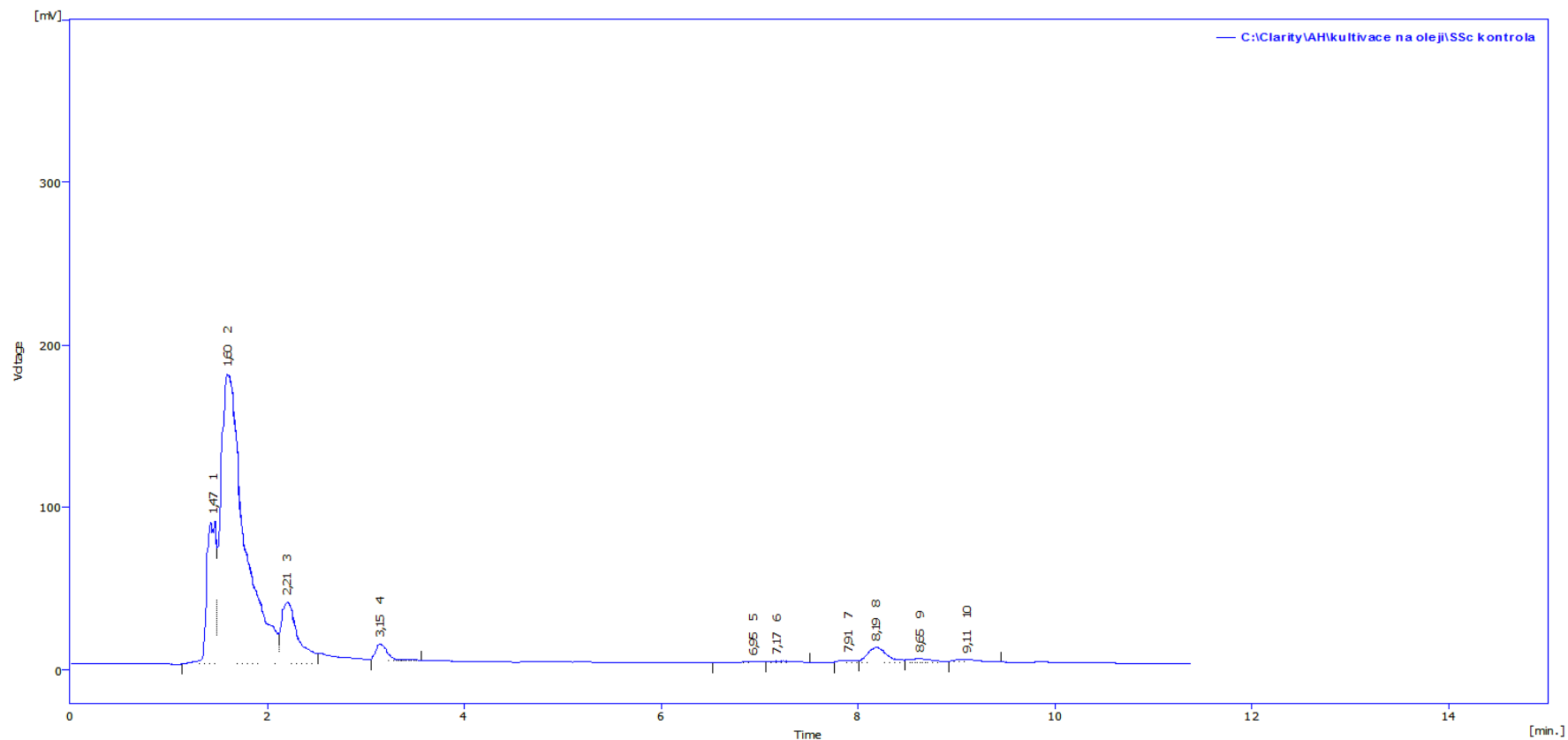
Obrázek P9: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Sporobolomyces roseus* na olejovém médiu série B metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

J CHROMATOGRAM SR – GLYCEROL SÉRIE A



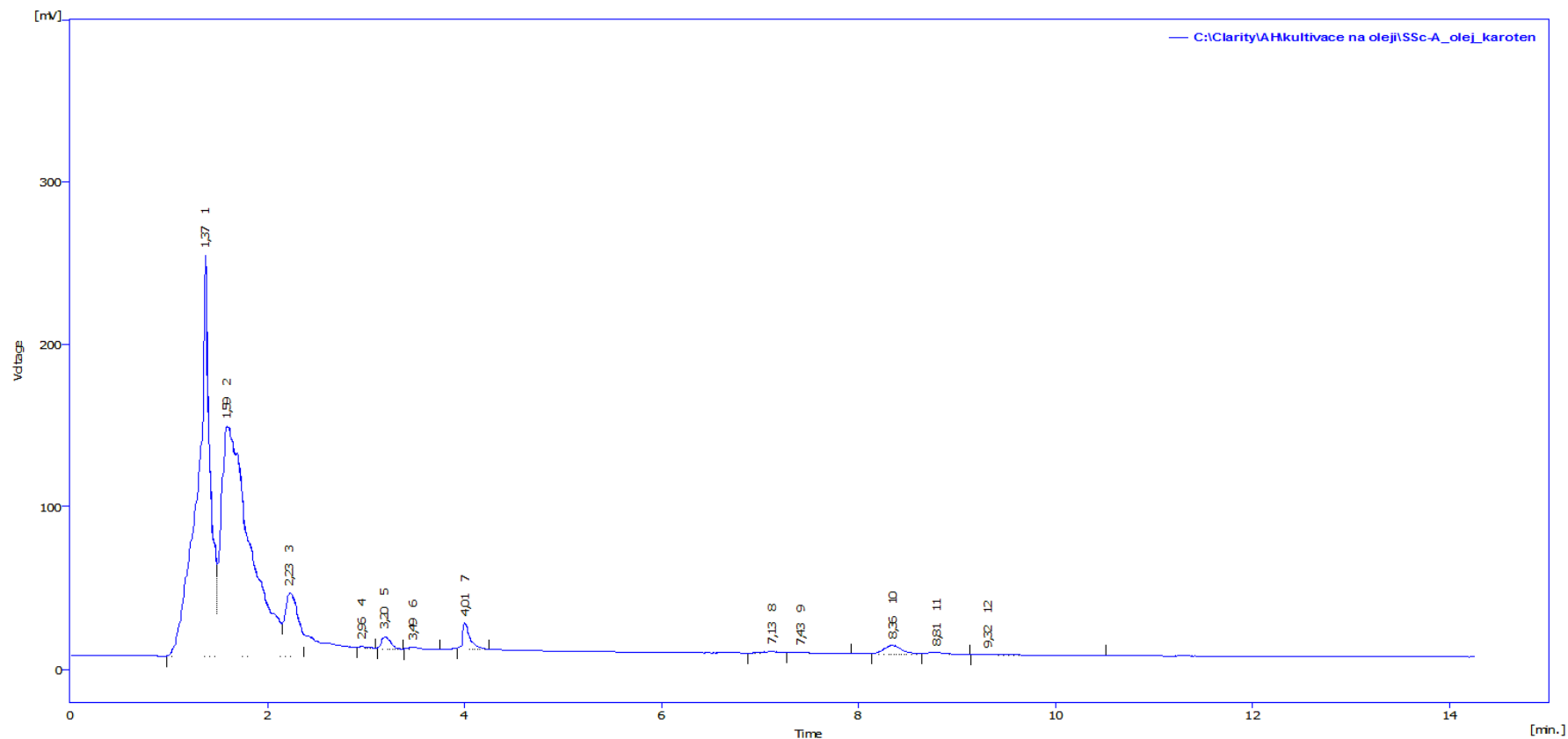
Obrázek P10: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Sporobolomyces roseus* na glycerolu série A metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

K CHROMATOGRAM SSC – KONTROLA



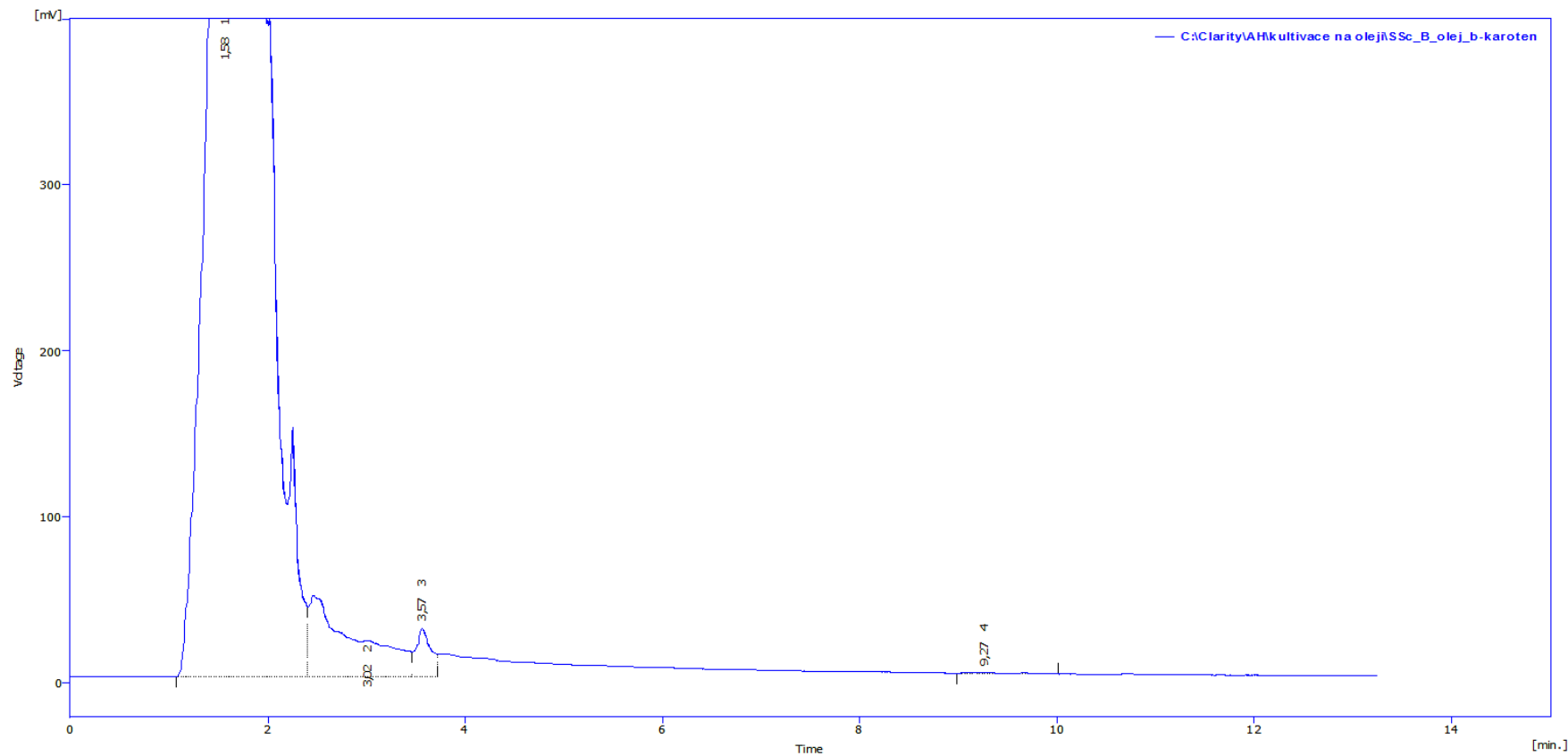
Obrázek P11: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Sporobolomyces shibatanus* na glukozovém médiu (kontrola) metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

L CHROMATOGRAM SSC – OLEJ SÉRIE A



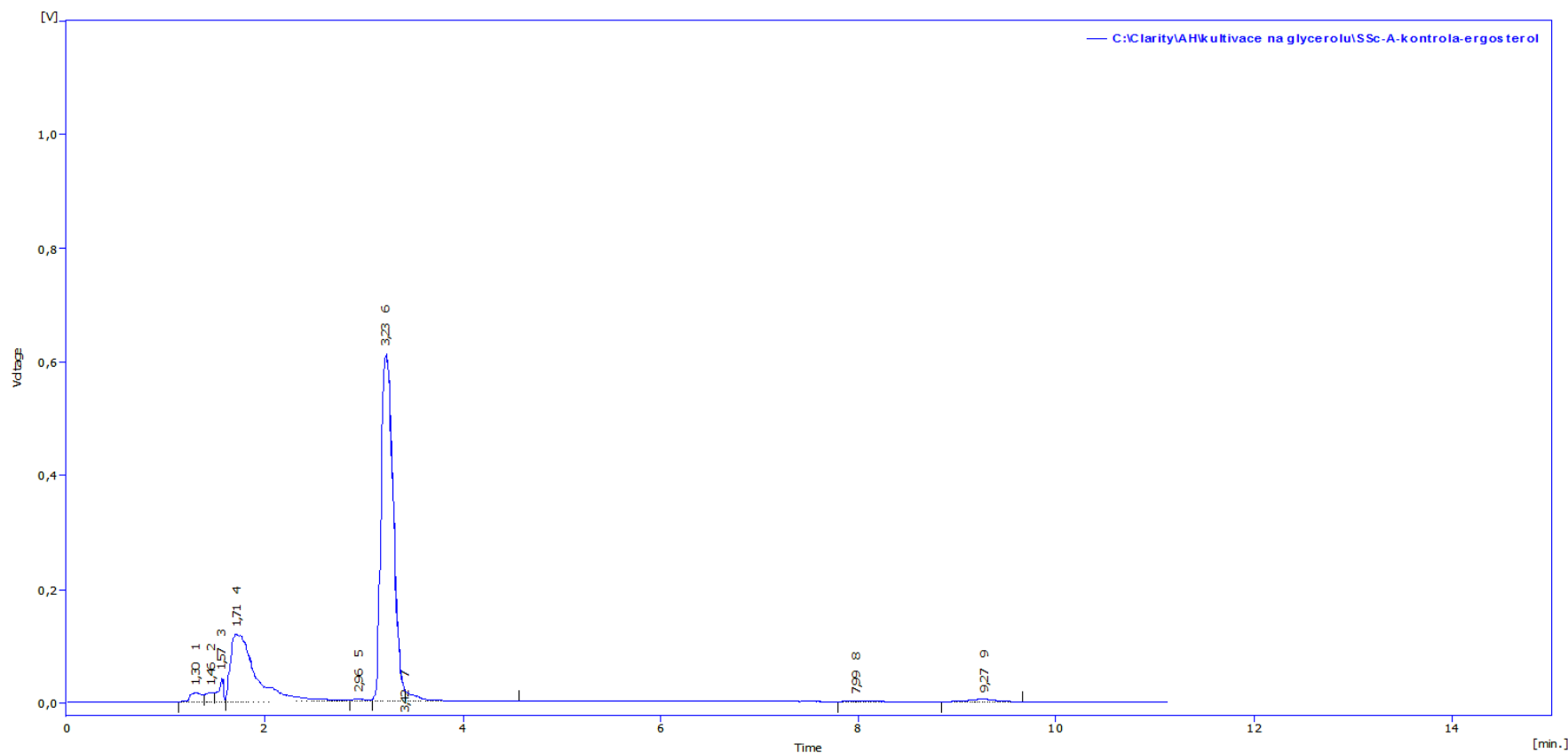
Obrázek P12: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Sporobolomyces shibatanus* na olojevém médiu série A metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

M CHROMATOGRAM SSC – OLEJ SÉRIE B



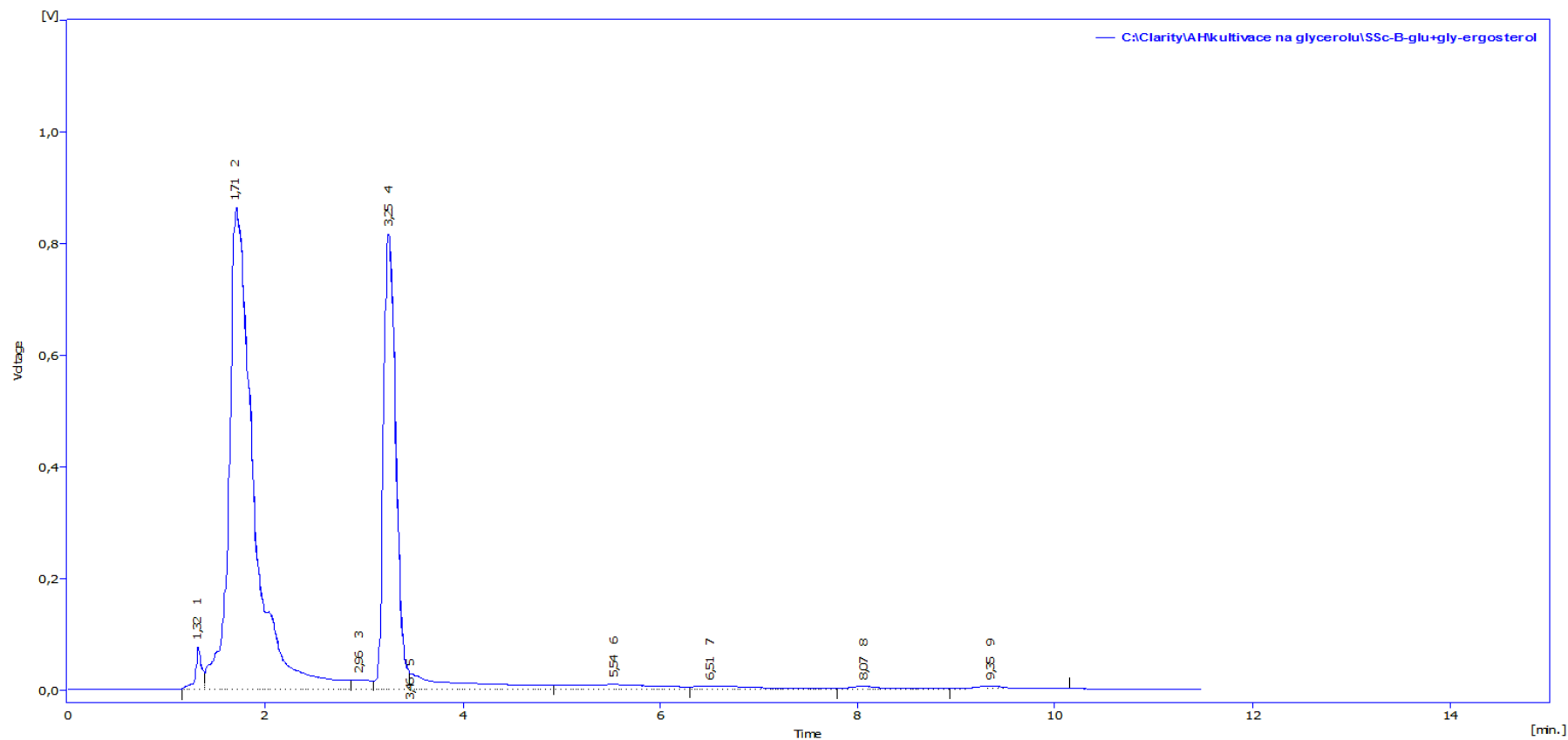
Obrázek P13: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Sporobolomyces shibatanus* na olojevém médiu série B metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu β -karotenu.

N CHROMATOGRAM SR – GLYCEROL KONTROLA SÉRIE A



Obrázek P14: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Sporobolomyces roseus* na glukozovém médiu - kontrola A metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu ergosterolu.

O CHROMATOGRAM SR – GLUKOSA-GLYCEROL 1:1 SÉRIE B



Obrázek P15: Chromatogram extraktu z kultivace kvasinky *Sporobolomyces roseus* na médiu glukóza-glycerol 1:1 metodou HPLC s UV/VIS detekcí, isokratickou elucí (mobilní fáze methanol) o průtoku $1\text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, pro zjištění obsahu ergosterolu.